

MARIZA BORTOLANZA

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE O NÚCLEO TEGMENTAR
PEDUNCULOPONTINO E A SUBSTÂNCIA NEGRA *PARS COMPACTA*
NOS PROCESSOS DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA**

Tese apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Doutor em
Farmacologia, pelo curso de Pós-
graduação em Farmacologia do Setor de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná.

CURITIBA

2010

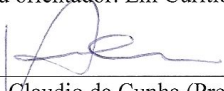


Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

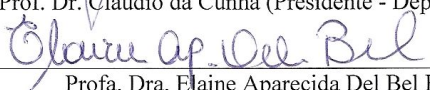


PARECER

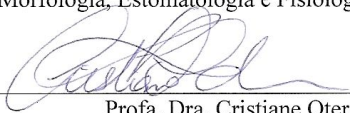
A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado “ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE O NÚCLEO PEDUNCULOPONTINO E A SUBSTÂNCIA NEGRA *PARS COMPACTA* NOS PROCESSOS DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA”, de autoria da pós-graduanda **MARIZA BORTOLANZA**, sob orientação do Prof. Dr. Claudio da Cunha e composta pelos professores: Prof. Dr. Claudio da Cunha (Presidente - Farmacologia - UFPR), Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães (Morfologia, Estomatologia e Fisiologia – USP Ribeirão Preto), Profa. Dra. Cristiane Otero Reis Salum (Matemática, Computação e Cognição - UFABC), Prof. Dr. Helio Afonso Ghizoni (Hospital de Clínicas - UFPR) e Profa. Dra. Anete Curte Ferraz (Fisiologia - UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi Aprovada. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 21 de maio de 2010.



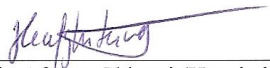
Prof. Dr. Claudio da Cunha (Presidente - Dep. Farmacologia - UFPR)



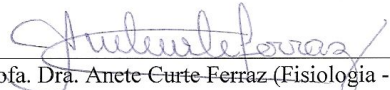
Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães
(Morfologia, Estomatologia e Fisiologia – USP Ribeirão Preto)



Profa. Dra. Cristiane Otero Reis Salum
(Matemática, Computação e Cognição - UFABC)



Prof. Dr. Helio Afonso Ghizoni (Hospital de Clínicas - UFPR)



Profa. Dra. Anete Curte Ferraz (Fisiologia - UFPR)

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1693 – Fax (41) 3266-2042 – pgfarmacologia@ufpr.br
<http://farmacologia.bio.ufpr.br/posgraduacao>

“O homem deve saber que de nenhum outro lugar, mas do encéfalo, vem a alegria, o prazer, o riso e a diversão, o pesar, o ressentimento, o desânimo e a lamentação. E por isto, de uma maneira especial, adquirimos conhecimento, e enxergamos e ouvimos e sabemos o que é justo e injusto, o que é bom e o que é ruim, o que é doce e o que é amargo... E pelo mesmo órgão tornamo-nos loucos e delirantes, e medos e terrores nos assombram... Todas essas coisas suportamos do encéfalo quando não está sadio... Neste sentido sou da opinião de que o encéfalo exerce o maior poder sobre o homem”.

-Hipócrates, Acerca das doenças sagradas (séc. IX a.C.)

Agradecimentos

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, principalmente:

Ao meu orientador professor Dr. Claudio da Cunha, por acreditar neste projeto, confiá-lo a mim e conduzi-lo a um resultado bem-sucedido.

Aos professores do departamento, por tudo o que fizeram para tornar a Farmacologia tão importante para a pós-graduação da UFPR e por toda instrução acadêmica fornecida aos meus colegas e a mim.

Aos meus amigos de laboratório e a todos do curso de pós-graduação por proporcionarem um ambiente agradável com cooperatividade, respeito e companheirismo. Especialmente, ao Edmar, à Evellyn, e à Patrícia que contribuíram com o desenvolvimento experimental dessa tese; à Caroline Capitelli, à Lucélia e à Suelen minhas companheiras de experimentos, por todas as discussões, correções ortográficas e principalmente pela amizade, apoio e carinho, o que agradeço também às amigas Scheila, Inara, Etielle, Lea e Marcelinho.

Às minhas queridas amigas e companheiras de departamento Silvia, Linda e Nair, por toda ajuda, torcida, carinho.

Aos colegas de biotério, por todo o suporte com a criação e manutenção dos animais para experimento.

Ao Dr. Philip Winn (University of Strathclyde), ao Dr. Duncan McLaren e à Dra. Mary Latimer (University of St Andrews) pelo apoio técnico no desenvolvimento de parte dos experimentos, além das valiosas contribuições que resultaram no presente manuscrito.

Às professoras Dra. Elaine Del Bel e Dra. Samia R. L. Joca (USP de Ribeirão Preto), Dra. Matilde Achaval (UFRGS) e ao professor Newton Canteras (USP de São Paulo) por me receberem em seus laboratórios, pela oportunidade de ampliar meus

conhecimentos e participar dos seus grupos de pesquisa, uma contribuição de valor inestimado na minha formação acadêmica e pessoal.

Aos novos amigos e colegas da USP de Ribeirão Preto, Aline, Angélica, Carol, Célia, Dani, Fernando, Mariana, Márcio, Nádia, Roberta, Marcelo, Marcelinho, Livia, Flávia, Marlene e a Carolina, por sentimentos que não consigo expressar, a vocês meu carinho, minha admiração e principalmente o meu muito obrigado, por tudo.

Meu reconhecimento e gratidão ao apoio financeiro à pesquisa provido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela International Brain Research Organization (IBRO).

A todos os colegas e amigos que nunca me deixaram sozinha nessa etapa, difícil, mas valorosa da minha vida, em especial ao meu e(x)terno orientador professor Dr. Claudio J. B. de Carvalho (departamento de Entomologia), principal responsável por minha formação científica.

Agradeço aos meus entes amados por ficarem ao meu lado, apesar dos incontáveis fins de semana e noites de ausência, consumidos na preparação deste trabalho.

Meu agradecimento mais que especial ao amor da minha vida, pelo apoio, carinho, respeito, paciência e, principalmente, por me encorajar a ser o que sou. Sem você Marcel, nada disso seria possível, nem valeria a pena.

Por fim, e de forma alguma menos importante, agradeço a Deus (o autor da vida) e a Nossa Senhora (mãezinha do céu) por me permitirem sentir suas presenças em meu coração e a transpor barreiras, que muitas vezes me pareciam intransponíveis.

“... A beleza maior, que transcende ao próprio tempo, é a descoberta de que somos impregnados de essência divina, que somos ungidos pelas mãos do Ser Supremo que criou o mundo à Sua imagem e que nos concede a graça de sermos os escultores dos Seus desígnios”.

Sumário

| | |
|--|------|
| Apresentação | vii |
| Lista de Abreviaturas..... | viii |
| Resumo | ix |
| Abstract..... | x |
| 1. Introdução..... | 11 |
| 1.1. Doença de Parkinson | 11 |
| 1.2. Modelos Animais da Doença de Parkinson..... | 12 |
| 1.3. Neuroanatomia dos núcleos da base..... | 13 |
| 1.4. Os núcleos da base como um sistema de escolha de ações | 14 |
| 1.5. Modulação Dopaminérgica dos Núcleos da Base | 16 |
| 1.6. Os núcleos da base formam um entre vários Sistemas de Memória | 18 |
| 1.7. Envolvimento da SNc e do PPTg na aprendizagem e memória..... | 21 |
| 2. Hipótese e Predições..... | 24 |
| 3. Objetivos..... | 24 |
| 4. Material, Métodos e Resultados | 24 |
| 5. Discussão..... | 25 |
| 6. Conclusão | 30 |
| 7. Referências Bibliográficas..... | 31 |
| Anexo 1. Artigo Científico | 48 |

Apresentação

Esta tese apresenta os resultados sob forma de artigo (anexo 1). Os itens Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no artigo e representam a íntegra deste trabalho.

Na tese, o item 5, Discussão, apresenta comentários gerais a respeito dos resultados obtidos no artigo. No item 6, Conclusão, são apresentadas as conclusões gerais da tese. As Referências Bibliográficas, item 7, referem-se às citações que aparecem na Introdução e na Discussão da tese.

Lista de Abreviaturas

| | | |
|--------|---|--|
| DP | - | Doença de Parkinson |
| SNc | - | Substância Negra parte compacta |
| PPTg | - | Núcleo Tegmentar Pedunculopontino |
| 6-OHDA | - | 6-hidroxidopamina |
| MPTP | - | 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina |
| SNr | - | Substância Negra parte reticulada |
| GPi | - | Globo Pálido interno |
| GPe | - | Globo Pálido externo |
| VTA | - | Área Tegmentar Ventral |
| STN | - | Núcleo Subtalâmico |
| GABA | - | Ácido γ -aminobutírico |
| CAR | - | Conditioned Avoidance Response |
| EI | - | Estímulo Incondicionado |
| EC | - | Estímulo Condicionado |
| ITC | - | Cruzamento interprovas |
| LTP | - | Potenciação de longa duração |
| LTD | - | Depressão de longa duração |

Resumo

O núcleo tegmentar pedunculo pontino (PPTg) projeta-se para os núcleos da base, incluindo a parte compacta da substância negra (SNc), cuja perda neuronal ocorre na doença de Parkinson (DP). Perda parcial e anormalidades funcionais dos neurônios do PPTg também estão associadas com essa doença. Pacientes com DP apresentam prejuízos cognitivos além dos distúrbios motores. Nossa hipótese é de que a interação entre o PPTg e a SNc deve ter um papel importante nos prejuízos cognitivos e, então, investigamos o quanto perturbações nas conexões entre o PPTg e a SNc prejudicam a aprendizagem em um teste de resposta condicionada de esquiva em ratos machos Wistar. Os seguintes grupos foram testados: PPTg-unilateral, SNc-unilateral, PPTg-SNc ipsilateral (lesões ipsilaterais no PPTg e na SNc), PPTg-SNc contralateral (lesões contralaterais no PPTg e na SNc) e lesões *sham* (de cada tipo). As lesões na SNc foram feitas com MPTP e as no PPTg com ácido ibotênico. Após a recuperação, todos os ratos foram submetidos a sessões de 50-tentativas no condicionamento de esquiva ativa de 2-vias durante três dias consecutivos. Ratos com lesão unilateral no PPTg ou SNc aprenderam essa tarefa entretanto, ratos com lesão unilateral combinada (mas não ipsilateral) em ambas estruturas não apresentaram sinal de aprendizagem. Esse efeito não foi devido a prejuízos sensório-motores porque as lesões não afetaram o tempo de reação ao som ou ao choque, nem a atividade locomotora dos animais nos intervalos interprovas durante o condicionamento. Entretanto, um número aumentado de não-respostas foi observado em ratos com lesões combinadas contralaterais em ambas as estruturas. Esses resultados suportam a hipótese de que uma interação funcional entre o PPTg e a SNc é necessária para a aprendizagem e o desempenho de respostas condicionadas de esquiva.

Abstract

The pedunculopontine tegmental nucleus (PPTg) targets nuclei in the basal ganglia, including the substantia nigra pars compacta (SNc), in which neuronal loss occurs in Parkinson's disease (PD). Partial loss and functional abnormalities of neurons in the PPTg are also associated with this disease. PD patients show cognitive impairments as well as motor disturbances. We hypothesized that the interaction of PPTg and SNc might be important for cognitive impairments and so investigated whether disrupting the connections between the PPTg and SNc impaired learning of a conditioned avoidance response (CAR) by male Wistar rats. The following groups were tested: PPTg-unilateral; SNc-unilateral; PPTg-SNc ipsilateral (ipsilateral lesions in PPTg and SNc); PPTg-SNc contralateral (contralateral lesions in PPTg and SNc); sham lesions (of each type). SNc lesions were made with MPTP and PPTg lesions with ibotenic acid. After recovery, all rats underwent 50-trial sessions of 2-way active avoidance conditioning for three consecutive days. Rats with unilateral lesions in PPTg or SNc learnt this however, rats with unilateral combined contralateral lesions (but not ipsilateral) in both structures presented no sign of learning. This effect was not likely to be due to sensorimotor impairment because lesions did not affect reaction time to the tone or footshock, neither locomotor activity in the inter-trial crossings during conditioning. However, an increased number of non-responses were observed in the rats with combined contralateral lesions. These results support the hypothesis that a functional interaction between PPTg and SNc is needed for conditioned avoidance responses learning and performance.

1. Introdução

1.1. Doença de Parkinson

Doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa progressiva caracterizada principalmente por sinais motores como *tremor em repouso*, por exemplo, das mãos e da mandíbula, sendo esse o sinal mais evidente da doença (Yanagisawa, 2006); *bradicinesia*, que consiste na lentidão dos movimentos voluntários e é responsável pelo início da incapacidade do paciente; e *rigidez muscular*, que pode ser definida como um aumento da resistência da articulação na execução de tais movimentos (Dauer & Przedborski, 2003). Esses sintomas são causados por uma deficiência de dopamina, devido à perda seletiva dos neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra (SNc). Além disso, a perda de neurônios colinérgicos do núcleo tegmentar pedunculopontino (PPTg) também é relatada em pacientes com DP (Hirsch *et al.*, 1987; Jellinger, 1988). Apesar das intensas pesquisas, a etiologia da DP ainda é desconhecida, mas postula-se que diversos fatores estejam relacionados à sua gênese, incluindo alterações genéticas, fatores ambientais, excitotoxicidade, neuroinflamação e estresse oxidativo (Przedborski & Ischiropoulos, 2005).

Apesar de ser classicamente considerada uma doença do sistema motor, os pacientes com DP também apresentam outros sintomas como perda de olfato, distúrbios do sono, depressão, e declínio cognitivo, que aparecem nos estágios iniciais, antes mesmo do aparecimento dos sintomas motores da doença (Dubois & Pillon, 1997; Carbon & Marie, 2003; Fahn & Sulzer, 2004; Yanagisawa, 2006; Hawkes *et al.*, 2010). Esses sintomas não-motores podem ter uma influência maior que os sintomas motores na qualidade de vida do paciente, por representarem um fator que desencadeia a necessidade de cuidados especiais (Da Cunha, 2006).

1.2. Modelos Animais da Doença de Parkinson

As desordens neurológicas em humanos podem ser reproduzidas em modelos animais através de procedimentos que mimetizam seus eventos patológicos e comportamentais. Além de fornecer uma ferramenta indispensável para a pesquisa básica, esses modelos permitem investigar estratégias terapêuticas como condições prévias para o teste de novas drogas em paciente.

A administração local de agentes neurotóxicos na SNc [6-hidroxidopamina (6-OHDA), metanfetamina, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e rotenona], e no PPTg [ácido ibotênico e o ácido kaínico] resultam na degeneração dessas estruturas, podendo induzir aspectos específicos da DP (Gerlach & Riederer, 1996; Betarbet *et al.*, 2002; Kahle *et al.*, 2002; Halbach *et al.*, 2004).

O MPTP foi descoberto em 1982, quando um grupo de usuários de drogas de abuso, na Califórnia, apresentou parkinsonismo severo. A investigação revelou que a síndrome foi causada pela administração de um análogo sintético da heroína que tinha sido contaminado por um subproduto, o MPTP (Beal, 2001). Posteriormente, modelos animais utilizando macacos, ratos (principalmente) e camundongos com lesão na SNc, pela toxina MPTP, foram propostos para o estudo das alterações cognitivas da DP (Jenner, 2003).

O MPTP pode ser administrado em camundongos por vias sistêmica (Potashkin *et al.*, 2007) ou intranasal (Rojo *et al.*, 2006). Em ratos, faz-se necessária a administração intranigral devido à sua menor sensibilidade ao composto, sendo, portanto, a administração sistêmica pouco efetiva (Sonsalla *et al.*, 1992; Storey *et al.*, 1992; Staal & Sonsalla, 2000). A administração de MPTP na SNc de ratos induz uma lesão parcial e específica da via nigro-estriatal, sem que os demais neurônios dopaminérgicos sejam afetados. Dessa forma, há uma diminuição da dopamina estriatal causando prejuízos cognitivos sem alterações motoras graves, o que representa um modelo da fase inicial da DP (Da Cunha *et al.*, 2001; Da Cunha *et al.*, 2002).

Como na DP ocorre também uma lesão parcial do PPTg, no presente estudo, reproduzimos esse quadro com lesões induzidas por ácido ibotênico. Injeções intracerebrais de aminoácidos excitatórios são bem conhecidas por causarem marcada perda neuronal na área injetada, sem lesão nos axônios de passagem e nos terminais nervosos de origem extrínseca (Coyle & Schwarcz, 1983 *apud* Fujimoto *et al.*, 1992). O ácido ibotênico causa lesões esfericamente demarcadas e de fácil delineamento, sem

causar alterações comportamentais como agressividade e hiperlocomoção observadas com a administração de ácido kaínico (Fujimoto *et al.*, 1992).

1.3. Neuroanatomia dos núcleos da base

Os núcleos da base podem ser considerados como um sistema de seleção de ações apropriadas a demandas ambientais (Redgrave *et al.*, 2008). Eles são compostos por um conjunto de estruturas subcorticais que se localizam na base do cérebro e tronco encefálico e possuem conexões distintas com o córtex, com o tálamo e outros núcleos do tronco encefálico (Knowlton, 2002). Fazem parte dos núcleos da base: o estriado, que nos primatas é formado pelo núcleo caudado e o putamen (em roedores esse conjunto forma o estriado dorsal ou neoestriado), o núcleo accumbens (*core* e *shell*) e o tubérculo olfatório (em conjunto, formam o estriado ventral nos roedores); o globo pálido externo e interno (nos roedores, o pálido interno corresponde ao núcleo entopeduncular), a substância negra compacta e reticulada e o núcleo subtalâmico (Parent & Hazrati, 1995b) (Figura 1).

O PPTg está intrinsecamente relacionado a várias estruturas dos núcleos da base através de um padrão amplo de interconectividade e funções comuns, sendo atualmente aceito como um de seus componentes (Garcia-Rill, 1991; Pahapill & Lozano, 2000; Mena-Segovia *et al.*, 2004 a; Alderson & Winn, 2005). Essas interações permitem ao PPTg modular a atividade dos núcleos da base de tal forma que perturbações no funcionamento de uma das estruturas tem consequências para a outra e vice-versa. Isso pode ser observado nas fisiopatologias causadas por distúrbios neurodegenerativos ou em modelos animais que afetam os núcleos da base, como a DP (Orieux *et al.*, 2000; Breit *et al.*, 2001), a paralisia supranuclear progressiva (Kasashima & Oda, 2003; Warren *et al.*, 2008) e a doença de Huntington (Uc *et al.*, 2003; Mena-Segovia *et al.*, 2004 b).

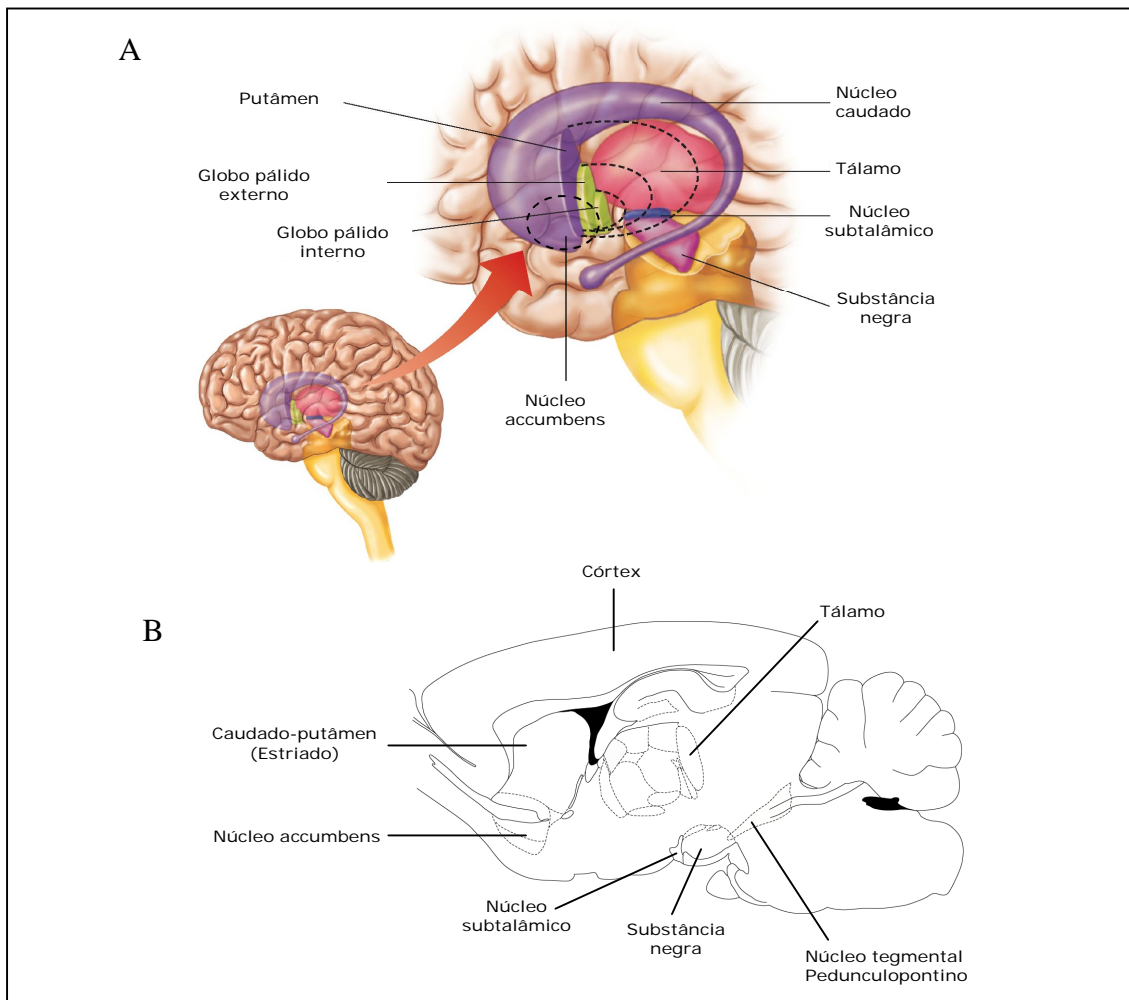


Figura 1. Neuroanatomia dos núcleos da base. Representação esquemática (A) tridimensional em humanos e (B) em ratos, modificado de Redgrave *et al.*, 2008.

1.4. Os núcleos da base como um sistema de escolha de ações

Os núcleos da base recebem informações a respeito de demandas ambientais e de ações que já estão sendo executadas pelo córtex motor e por núcleos subcorticais através do estriado, sua principal estrutura de entrada de informações (Parent & Hazrati, 1995a; Nicola, 2007).

As possíveis ações a serem ordenadas por regiões motoras do córtex frontal (ativado por núcleos talâmicos) ou por núcleos do tronco encefálico autonômicos e motores estão sob a inibição tônica das estruturas de saída dos núcleos da base, a parte reticulada da substância negra (SNr) e o globo pálido interno (GPi). Neurônios inibitórios que se projetam do estriado para esses núcleos de saída podem liberar uma

ação específica ao remover a inibição tônica imposta pela SNr/Gpi aos neurônios tálamo-corticais. Esses neurônios estriatais compõem a via direta (Alexander *et al.*, 1986).

Uma vez iniciada a ação, pela via direta, ela deve ser finalizada. Isso ocorre através da reativação dos neurônios da SNr e do GPi pela via indireta. Por meio dessa via, o estriado inibe a parte externa do globo pálido (GPe) que, por sua vez, remove a ação inibitória sobre a SNr/GPi, restaurando a inibição imposta por esses núcleos sobre as regiões motoras do tálamo (Albin *et al.*, 1989; Parent & Hazrati, 1995b; a).

Para que uma ação específica, selecionada pelos núcleos da base, seja ativada, há necessidade da inibição de outras ações concorrentes, aquelas que não fazem parte do objetivo do córtex naquele momento. Essas ações indesejadas são contidas pelos neurônios da via hiperdireta, uma via de excitação breve que não envolve o estriado, mas uma ativação do núcleo subtalâmico (STN) diretamente pelo córtex. Como resultado há uma inibição das ações indesejadas do repertório do sujeito. Isso permite que a ação apropriada para o objetivo estabelecido pelo córtex seja liberada através da ativação da via direta (Nambu, 2002). Portanto, o bom funcionamento dos núcleos da base resulta de um delicado equilíbrio entre essas vias (Figura 2).

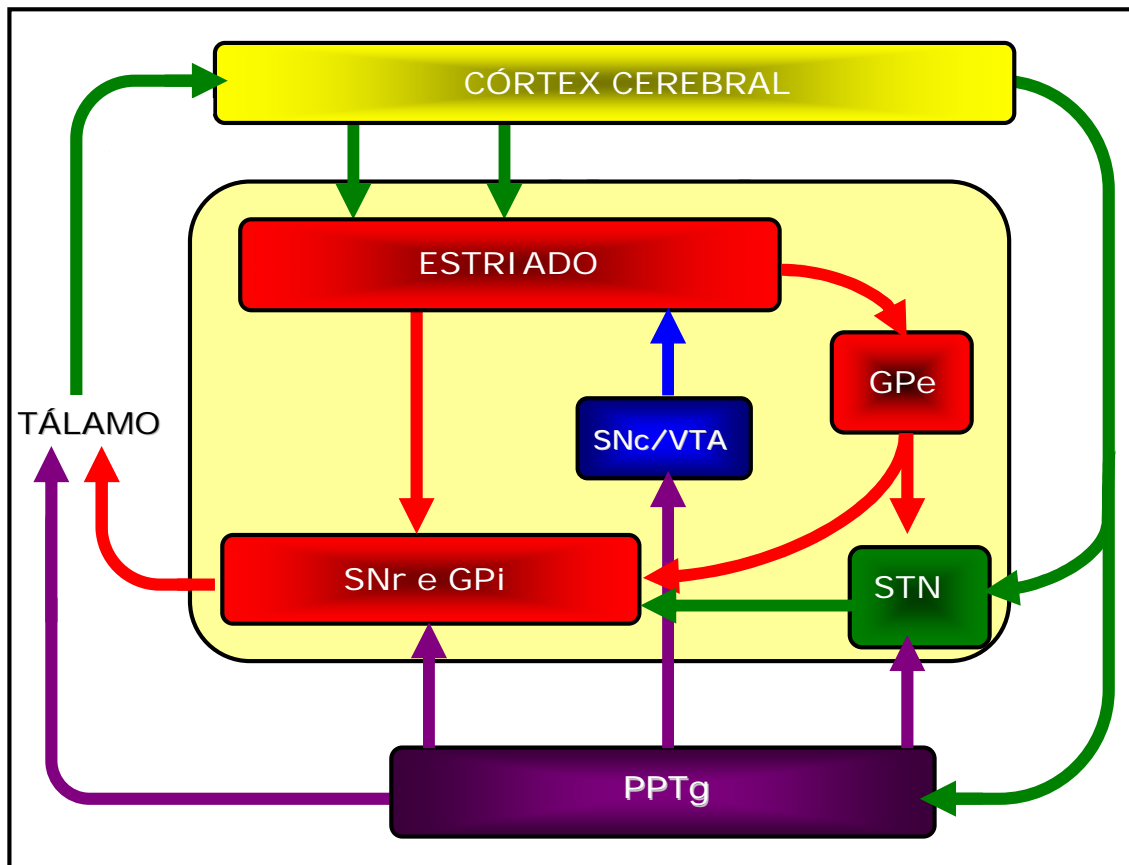


Figura 2. Diagrama das principais conexões dos núcleos da base indicando as vias direta, indireta e hiperdireta. As setas vermelhas indicam projeções GABAérgicas; setas verdes projeções glutamatérgicas, seta azul projeções dopaminérgicas, setas roxas projeções do PPTg (colinérgicas e não-colinérgicas); VTA, área tegmentar ventral; GPe, globo pálido externo; GPi, Globo pálido interno; STN, núcleo subtalâmico; PPTg, núcleos tegmental pedunculopontino; SNc, substância negra pars compacta; SNr, Substância negra pars reticulata. Adaptado de Blandini et al. 2000 e Mena-Segorvia et al. 2004.

1.5. Modulação Dopaminérgica dos Núcleos da Base

A escolha de uma resposta comportamental adequada depende da modulação das vias direta e indireta por níveis tônicos de dopamina (Gulley & Rebec, 1999).

O processo de escolher ações em resposta a estímulos ambientais que sinalizam uma consequência pode ser aprendido. Recentemente foi proposto um mecanismo na tentativa de melhor entender o funcionamento dos núcleos da base. Trata-se do modelo do mosaico de espelhos quebrados, o qual propõe a existência de unidades funcionais redundantes no estriado. Essas unidades representam (i) partes do corpo do sujeito, (ii) objetos com os quais ele pode interagir, e (iii) locais para onde ele pode se mover. Há

evidências de que, quando um sujeito encontra-se frente a um estímulo biologicamente saliente (por exemplo, um objeto ou ambiente que sinalize uma recompensa iminente ou uma situação aversiva), os neurônios do mesencéfalo respondem com uma liberação física de dopamina no estriado. Consequentemente, há um reforço nas sinapses córtico-estriatais das unidades que representam, ao mesmo tempo, a parte do corpo (que vai realizar a ação) e o objeto ou o estímulo para o qual a ação é direcionada (Da Cunha *et al.*, 2009b). Portanto, a liberação física de dopamina pode ser considerada um sinal de que a associação entre as unidades funcionais do estriado, que codificam a ação de uma parte do corpo em direção a um estímulo ambiental, deve ser reforçada (Matsumoto & Hikosaka, 2009a). O reforço dessa ação (que resultou em uma recompensa) aumenta a probabilidade de que ela seja desencadeada pelo mesmo estímulo.

A liberação física de dopamina é feita pela parte compacta da substância negra, uma região que concentra corpos de neurônios dopaminérgicos amplamente dispersos por toda a região e adjacências (Fallon, 1985) e com projeções expressivas para o corpo estriado (Packard & Knowlton, 2002). A SNc desempenha um papel modulatório sobre os comportamentos motores (Da Cunha *et al.*, 2009a). Assim, os neurônios dopaminérgicos influenciam a forma como os núcleos da base escolhem e desencadeiam o início e o término das ações motoras voluntárias, bem como o aprendizado sobre quais são as ações que resultam em recompensa, formando as chamadas memórias de procedimento (Da Cunha *et al.*, 2009b).

A dopamina é responsável por diminuir a ação inibitória dos núcleos da base sobre os núcleos motores do tálamo. Assim, ela facilita a ativação de ações motoras pelos neurônios talâmico-corticais. Em estados patofisiológicos, como na DP, onde ocorre perda de neurônios da SNc, há uma diminuição de dopamina, levando a um aumento na atividade da via indireta e a uma redução na via direta. Esses efeitos somados geram um aumento na média dos disparos dos neurônios do GPi e da SNr, que suprimem a atividade de neurônios do tálamo e, consequentemente, o córtex motor deixa de ser ativado, gerando a acinesia (falha na escolha de ações motoras) observada na DP (Nambu, 2002).

Além da SNc, o PPTg também exerce uma forte modulação sobre os núcleos da base. Com base em sua densidade celular, o PPTg divide-se em: PPTg *pars compacta* (PPTgc), e PPTg *pars dissipatus* (PPTgd). O PPTgc é composto, principalmente, por neurônios colinérgicos (designados Ch5, por Mesulam) que podem conter outros neurotransmissores além da acetilcolina, tais como a substância P, o glutamato e o

óxido nítrico (Vincent & Kimura, 1992; Lavoie & Parent, 1994a; 1994b; Bevan & Bolam, 1995). O PPTgd contém neurônios não-colinérgicos que possuem como principal neurotransmissor o ácido γ -aminobutírico (GABA) (Spann & Grofova, 1992; Ford *et al.*, 1995; Honda & Semba, 1995; Takakusaki *et al.*, 1996). Localizado na ponte, caudal à substância negra e adjacente ao pedúnculo cerebelar superior (Carlson *et al.*, 1999), o PPTg possui extensivas conexões ascendentes e descendentes com estruturas dos núcleos da base e outros núcleos do tronco encefálico e do cérebro, além de neurônios individuais que são conhecidos por possuírem ambas conexões (Semba *et al.*, 1988) (Fig. 2).

O PPTg pode regular a atividade dos núcleos da base por vários mecanismos: (i) atuação direta sobre os núcleos de saída (SNr e GPi), influenciando a informação antes de ela atingir seu alvo final, (ii) atuação direta sobre o STN, juntamente com projeções provenientes do córtex e do GPe, afetando a atividade da via hiperdireta (Bevan & Bolam, 1995), e (iii) atuação sobre a SNc e VTA, alterando a liberação de dopamina no estriado, podendo afetar toda a atividade dos núcleos da base (Mena-Segovia *et al.*, 2008).

Ambas estruturas respondem a estímulos salientes e estão envolvidas com o processamento de informações sensoriais polimodais (*e.g.*, um neurônio responde ao mesmo tempo a estímulos visuais e auditivos), além de receberem informações provenientes do sistema límbico (*e.g.* amígdala) sobre o valor hedônico dos estímulos (apetitivos ou aversivos). Como a SNc e a VTA recebem aferências do PPTg, há evidências de que ele contribua para a resposta fásica da dopamina a esses estímulos, o que poderia explicar a contribuição do PPTg no aprendizado de ações motoras que resultam em recompensa (Mena-Segovia *et al.*, 2008).

1.6. Os núcleos da base formam um entre vários Sistemas de Memória

Durante muito tempo debateu-se, intensamente, a possibilidade de a memória ser uma função unitária ou decomposta em diferentes sistemas. A partir de estudos de quadros degenerativos cerebrais graves, em que há grande comprometimento da memória declarativa (como na doença de Alzheimer), observou-se que outros tipos de memória ainda são conservados (Izquierdo, 2002). Portanto, a idéia de que podem

existir várias formas ou tipos de memória foi estabelecida (Eichenbaum, 2001; Poldrack & Packard, 2003; Squire, 2004; Squire *et al.*, 2004; Voermans *et al.*, 2004).

Várias propostas existem para classificar a memória e estão baseadas em sistemas que dependem ou independem de estruturas encefálicas determinadas. Dentro das consideradas memórias de longa duração encontram-se dois grandes grupos (Figura 3) (i) memórias declarativas ou explícitas, que podem ser relatadas e evocadas de forma consciente, como fatos, eventos e conceitos; e (ii) memórias não-declarativas ou implícitas, aquelas que podem ser evocadas de forma automática ou inconsciente, sendo muitas vezes expressas como um procedimento motor desempenhado para atingir um objetivo ou por hábito, as habilidades percepto-motoras e cognitivas. Em todos esses casos elas podem ser demonstradas apenas através de seu desempenho, e não por um relato verbal (Cohen *et al.*, 1984; Salmon & Butters, 1995; Izquierdo, 2002; Squire, 2004). Outra forma de diferenciar as memórias declarativas das não-declarativas é considerar as primeiras como o “saber que” e as últimas como “saber como” (fazer algo).

As memórias declarativas foram mais bem estudadas e caracterizadas nos últimos anos, principalmente a partir dos trabalhos da psicóloga Brenda Milner com o paciente H.M. (Squire, 2004). Como forma de tratamento às crises epiléticas graves, esse paciente sofreu uma ressecção bilateral do lobo temporal medial. Após quatro anos de estudos, Scoville e Milner (1957) descreveram o prejuízo de memória observado em H.M. e ressaltaram a importância do hipocampo nesses processos. A partir de então, o hipocampo e suas conexões foi considerado como substrato neuronal das memórias declarativas (Squire, 1992).

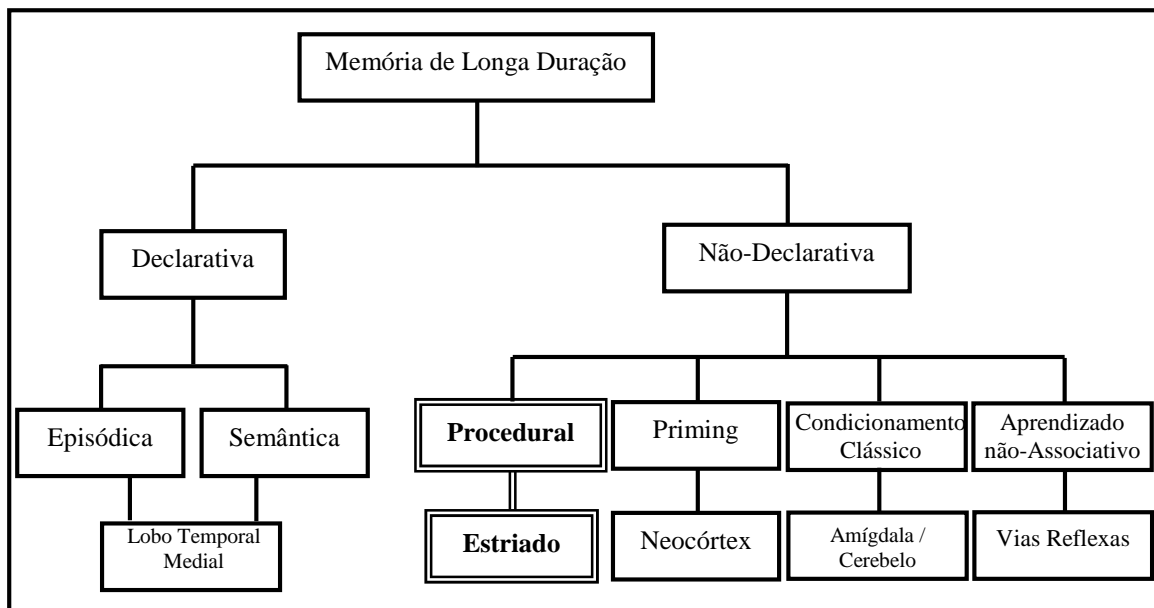


Figura 3. Esquema da classificação da memória de longa duração e as estruturas cerebrais importantes para cada tipo de memória (modificado de Squire, 2004).

Por outro lado, as memórias não-declarativas, não foram tão amplamente estudadas. Esse tipo de memória divide-se em diversas categorias, envolvendo as habilidades e memórias de procedimento tais como as ações aprendidas por condicionamento instrumental (voltadas para um objetivo e os hábitos estímulo-resposta) e as associações aprendidas por condicionamento pavloviano. Todos esses tipos de memória são mediados por estruturas cerebrais distintas (Squire, 1992; 1993). Muitos hábitos são adquiridos no início da vida, sem esforço óbvio e sem que seja observado o momento em que tenham ocorrido (Squire & Kandel, 2003). O aprendizado de hábito é descrito como um comportamento adquirido paulatinamente, quando um estímulo é associado de forma repetida a uma resposta seguida de um reforço. Acredita-se que esse aprendizado aconteça de forma inconsciente (daí a denominação de memória implícita), porém, os estudos mais recentes demonstram que ele é adquirido como um comportamento que tem por objetivo obter uma recompensa. Essa recompensa reforça a associação entre o estímulo que precedeu a ação (e que sinalizava a possibilidade de se obter a recompensa) e a resposta ou ação propriamente dita, de forma que ela pode se tornar automática (inconsciente). A partir desse momento, essa ação passa a ser um hábito estímulo-resposta, ou seja, uma resposta desencadeada pelo estímulo de forma automática, sem que o sujeito esteja

necessariamente objetivando obter a recompensa. Esse aprendizado é modulado principalmente pelas vias dopaminérgicas meso-estriatais. Acredita-se que os traços biológicos da memória de hábito sejam armazenados no estriado (principalmente no putamen em primatas e no estriado dorso-lateral nos roedores), de forma independente do lobo temporal medial que é mais importante na formação de memórias episódicas (Hood *et al.*, 1999).

1.7. Envolvimento da SNc e do PPTg na aprendizagem e memória

Nos ratos, a lesão ou manipulação da SNc prejudica o aprendizado de várias tarefas de memória de procedimento, tais como o labirinto aquático de Morris (Miyoshi *et al.*, 2002; Da Cunha *et al.*, 2003; Ferro *et al.*, 2005; Da Cunha *et al.*, 2007), a esquiwa ativa de 2-vias (Da Cunha *et al.*, 2001; Gevaerd *et al.*, 2001a; Gevaerd *et al.*, 2001b), e a esquiwa inibitória (Del Guante *et al.*, 2004). Prejuízos nesse tipo de aprendizado, bem como na formação de hábitos estímulo-resposta, têm sido observados em pacientes com DP e em modelos animais dessa doença em camundongos, ratos e macacos (Kimura, 1995; Salmon & Butters, 1995; Knowlton *et al.*, 1996a; Roncacci *et al.*, 1996; Grahm *et al.*, 2009b).

Da mesma forma, ratos com lesões específicas no PPTg apresentam déficits para responder a estímulos incondicionados e condicionados em tarefas de aprendizagem estímulo-resposta(ação)-consequência (Inglis *et al.*, 1994; Inglis *et al.*, 2000; Alderson *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2009) como no labirinto radial de 8 braços com dica visual (Keating & Winn, 2002; Taylor *et al.*, 2004), e são mais resistentes a desenvolver o comportamento de auto-administração de drogas de abuso (Olmstead & Franklin, 1994; Olmstead *et al.*, 1998; Corrigall *et al.*, 2001; Corrigall *et al.*, 2002; Alderson *et al.*, 2004) e de auto-estimulação intracraniana de corrente elétrica em áreas ligadas a reforço (*e.g.* VTA) (Yeomans *et al.*, 1993; Lepore & Franklin, 1996). Estes animais podem aprender uma tarefa operante condicionada quando o grau de dificuldade é pequeno, como nos casos em que foram pré-treinados antes da lesão (Alderson *et al.*, 2004; Winn, 2006). Déficits em testes de atenção têm sido observados, contudo, Winn e colaboradores afirmam que os baixos escores podem ser mais bem explicados como

uma dificuldade em organizar uma resposta (Winn, 2006; Rostron *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2009).

A função precisa do PPTg e da SNc na formação de memórias de procedimento não está completamente elucidada, mas há evidências de que essas estruturas informam aos núcleos da base que há algo novo e relevante para ser aprendido a respeito da melhor ação para responder a um estímulo ambiental que sinaliza uma consequência reforçadora ou aversiva. O componente colinérgico do PPTg ativa os neurônios dopaminérgicos da SNc e VTA que, por sua vez, fornecem a sinalização sobre a presença de um estímulo saliente para os núcleos da base (Mena-Segovia *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2009).

Os neurônios dopaminérgicos da SNc atuam, não apenas na formação de memórias de procedimento mediada por recompensa (*e.g.* reforço apetitivo), mas também naquelas onde o animal aprende a emitir uma resposta comportamental que resulte em evitar uma punição (*e.g.* por um estímulo aversivo). Esse tipo de comportamento é denominado resposta de esquiva. O comportamento de resposta condicionada de esquiva (conditioned avoidance response – CAR) está entre os mais estudados, como no modelo animal conhecido como esquiva ativa de 2-vias (Bolles, 1970). Nesta tarefa os ratos aprendem evitar um choque nas patas (estímulo incondicionado - EI) cruzando para o lado oposto de uma caixa com duas câmaras em resposta a um estímulo sonoro ou luminoso (estímulo condicionado - EC). O aprendizado deste teste envolve tanto o condicionamento clássico (pavloviano) como o instrumental (Bolles, 1970).

O condicionamento clássico é um tipo de aprendizado no qual um organismo (rato) aprende a prever a iminência de um evento apetitivo ou aversivo por um sinal que o antecede. Tais eventos eliciam uma resposta inata (sem necessidade de aprendizagem) e são chamados de estímulos incondicionados (EI). O sinal ou dica da iminência do EI é chamado de estímulo condicionado, pois inicialmente o animal não sabe da relação desse estímulo com a iminência do EI. Ele aprende a fazer essa associação (EC-EI) pelo condicionamento clássico. Após o condicionamento clássico, onde o EC é pareado com o EI, o animal passa a responder ao EC da mesma forma como respondia ao EI. Uma característica importante do condicionamento clássico é que ele não envolve o aprendizado de nenhuma resposta - o animal já sabia emitir a resposta ao estímulo incondicionado de forma inata. O que ele aprende é que após o EC, ele será exposto ao EI (apetitivo ou aversivo) e que não há nada a fazer. Ou seja, nenhuma resposta é

aprendida. O que é aprendido é uma associação entre estímulos. Esse é um processo de aprendizagem relativamente automático de respostas emocionais frente a estímulos.

Já no condicionamento instrumental, ou aprendizagem estímulo-resposta, o animal aprende que pode obter o EI (recompensa ou punição) dependendo da sua resposta comportamental ao EC. Trata-se de uma aprendizagem ou condicionamento da associação entre um estímulo (EC), uma resposta motora e uma consequência (EI). Há algumas décadas questiona-se se o animal estaria aprendendo a relação entre a resposta e a consequência ou se simplesmente aprenderia a responder ao EC de forma automática, sem ter a intenção de receber a recompensa ou evitar a punição. Estudos mais recentes mostram que os dois tipos de aprendizagem acontecem. Inicialmente o animal aprende a associar a resposta à consequência: aprende a responder ao EC para receber a recompensa/evitar a punição. Porém, com o tempo, ele passa a responder de forma automática (por hábito) ao EC, sem cogitar da consequência que costuma resultar desse comportamento. É o que se chama de hábito estímulo-resposta (Eichenbaum, 2008).

Na esquivas ativa de 2-vias, o rato aprende que um comportamento determinado (como cruzar para o lado oposto da caixa), tem como consequência evitar uma punição (choque nas patas). Ele também aprende que essa consequência só acontece durante a apresentação de um estímulo que funciona como uma dica da iminência do evento aversivo. No caso, ele aprende que depois do EC (campainha ou luz) sucede um EI (choque) que pode ser evitado pela resposta instrumental de cruzar para o outro lado da caixa. Portanto, o condicionamento instrumental é um processo através do qual o animal aprende a dar respostas de forma a obter um benefício ou a evitar algo desagradável. Estudos têm demonstrado que ratos com lesão no estriado tendem a apresentar prejuízo na aquisição de associações entre estímulos e respostas motoras (Packard & White, 1990; Packard & McGaugh, 1992; McDonald & White, 1994; Racht-Delattre & El Massioui, 1999; Colombo, 1989).

No presente estudo, testaremos o quanto uma interação funcional entre o PPTg e a SNc é necessário para a aprendizagem da esquivas ativa de 2-vias. Para isso faremos uso da técnica de desconexão funcional com lesões unilaterais simultâneas nessas estruturas. Este método baseia-se na premissa de que se duas estruturas estiverem conectadas em série, suas funções podem ser prejudicadas por hemi-inativação, de ambas as estruturas, nos hemisférios cerebrais opostos (Parkinson *et al.*, 2000).

2. Hipótese e Predições

A aprendizagem de uma resposta condicionada de esquiva (CAR) depende de uma interação funcional entre o PPTg e a SNc.

Se esta hipótese for verdadeira, esperamos que lesões combinadas no PPTg e na SNc de ratos prejudiquem a aprendizagem de uma CAR, como na tarefa da esquiva ativa de 2-vias. Além disso, ratos com lesão unilateral em apenas uma dessas estruturas não deverão apresentar prejuízos tão severos quanto os com lesões combinadas.

3. Objetivos

Dentro do contexto apresentado, o objetivo deste trabalho foi testar a hipótese acima investigando o envolvimento do PPTg e da SNc, bem como de suas conexões nos processos de aprendizagem de resposta de esquiva condicionada - CAR.

Mais especificamente, buscamos verificar:

- Se é possível para ratos com lesão unilateral no PPTg ou na SNc, o aprendizado da tarefa de esquiva ativa de 2-vias.
- Se a lesão unilateral simultânea da SNc e do PPTg tem efeito sobre desempenho desses ratos.

4. Material, Métodos e Resultados

Todo o material utilizado, a metodologia e as técnicas empregadas, bem como os resultados estão descritos no manuscrito apresentado no anexo 1.

5. Discussão

Os resultados do presente trabalho mostram que as conexões entre o PPTg e a SNc desempenham um papel importante na aprendizagem da resposta condicionada de esquiva, uma vez que os ratos com lesões simultâneas contralaterais em ambas estruturas não apresentaram sinal de aprendizagem. Além disso, podemos observar que os ratos do grupo PPTg-SNc contralateral apresentaram um prejuízo maior quando comparados aos do grupo PPTg-SNc ipsilateral. Isso se deve ao modo como estas estruturas estão ligadas, em série. Esses dados estão de acordo com a literatura, segundo a qual, as projeções do PPTg à SNc se dão de forma predominantemente ipsilateral, embora um grau de inervação contralateral também seja observado (Beninato & Spencer, 1987; Clarke *et al.*, 1987; Beninato & Spencer, 1988; Gould *et al.*, 1989; Mena-Segovia *et al.*, 2008). Essa inervação contralateral, por não ser tão densa, deve ter sido responsável pelo prejuízo menos severo, apresentado por ratos com lesão unilateral no PPTg e na SNc no mesmo hemisfério cerebral. Dessa forma, podemos sugerir que as projeções ipsilaterais do PPTg à SNc são críticas, enquanto as projeções contralaterais não são suficientes para suportar uma aprendizagem condicionada de esquiva.

Acredita-se, que tais projeções podem modular a atividade dos neurônios dopaminérgicos da SNc através da liberação de acetilcolina e glutamato (Scarnati *et al.*, 1984; Scarnati *et al.*, 1986; Gould *et al.*, 1989; Futami *et al.*, 1995; Di Giovanni & Shi, 2009). Nesse sentido, a literatura mostra que as ativações elétrica e química (administração de antagonista GABA-A, bicuculina) do PPTg desencadeiam disparos contínuos nas células dopaminérgicas da SNc (Lokwan *et al.*, 1999; Floresco *et al.*, 2003), um efeito fisiológico que depende das projeções colinérgica e glutamatérgicas (Lester *et al.*, 2010; Sesack & Grace, 2010). Também Kitai e colaboradores (1999) mostraram que a liberação de dopamina em fatias de mesencéfalo depende da presença de agonista colinérgico. Além disso, trabalhos com cronoamperometria *in vivo* mostraram que a estimulação do PPTg desencadeia liberação de dopamina no estriado: uma liberação inicial rápida, seguida de uma liberação prolongada. A fase inicial foi bloqueada pela infusão intra-nigral de antagonistas de receptores nicotínicos e antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos. A fase de liberação prolongada foi seletivamente bloqueado pela infusão de antagonistas dos receptores muscarínicos (Lester *et al.*, 2010). Entretanto, o PPTg pode causar liberação dopaminérgica estriatal, não somente por ativar a SNc diretamente, mas também via projeções

colinérgicas/glutamatérgicas para neurônios glutamatérgicos excitatórios do núcleo subtalâmico, que por sua vez inervam os neurônios dopaminérgicos da SNc (Lester *et al.*, 2010).

Dessa forma, o PPTg pode promover a sinalização necessária para que os neurônios dopaminérgicos gerem um sinal de erro de predição da recompensa: ao escolher uma ação como resposta a uma demanda ambiental, o animal espera através dela atingir seu objetivo. Na maioria das vezes esse objetivo é o de obter algo com valor hedônico positivo – uma recompensa. No caso da esquiva ativa, a ação escolhida visa evitar uma punição (choque). Portanto, ao cruzar para o outro lado da caixa o animal “espera” se evitar do choque. Se isso não acontece houve um erro em sua predição. Existem evidências de que a quantidade de dopamina liberada no estriado quantifica esse erro. Quanto maior o erro, maior a quantidade de dopamina liberada depois da ação. Ocorre também liberação de dopamina em resposta a um estímulo que sinaliza a iminência do choque. No caso da esquiva ativa de 2-vias é provável que a dopamina seja liberada quando o animal escuta a campainha e espera na sequência receber o choque. Quando ele aprende a fazer uma ação que resulta em evitar o choque, ele deixa de liberar dopamina. Portanto, segundo a teoria do papel da dopamina como sinalizadora do erro de predição, a ativação fásica dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo é máxima quando o choque é liberado de forma imprevisível, ou seja, quando o animal não espera receber uma punição e recebe. Por outro lado, tal ativação é baixa em condições de certeza, quando o animal já aprendeu que a probabilidade de ocorrência do choque é máxima após a apresentação do som: o animal espera receber o choque e recebe. Em relação à esquiva ativa dizemos que esse fenômeno provavelmente ocorre levando em conta os estudos com a liberação de dopamina durante a aprendizagem de outras tarefas, algumas de natureza apetitiva (Fiorillo *et al.*, 2003), outras de natureza aversiva (Matsumoto & Hikosaka, 2009a). Essa hipótese é coerente com nossos resultados, mas não temos notícia de estudos de eletrofisiologia ou de registro da liberação de dopamina que a confirme. O que nossos resultados nos permitem afirmar com maior certeza é que a dopamina liberada pela SNc em consequência da ativação do PPTg é importante para a aprendizagem de ações cujo resultado pode evitar um estímulo aversivo. Essa conclusão recebe também o suporte de outros estudos (Pan & Hyland, 2005; Kobayashi & Okada, 2007; Mena-Segovia *et al.*, 2008).

As projeções ipsilaterais do PPTg à SNc parecem também ser importantes para a iniciação da resposta de esquiva, pois os ratos com lesão contralateral no PPTg e na SNc apresentaram um grande número de não-respostas aos EC e EI. Podemos sugerir então que, assim como pacientes com doença de Parkinson (Grahm *et al.*, 2009a), os ratos do grupo PPTg-SNc contralateral tiveram dificuldade em escolher e/ou iniciar as ações apropriadas. Eles não tiveram prejuízo em desempenhar todas as ações de seu repertório, eles não tiveram problemas para se mover na caixa de esquiva durante os ITCs nem apresentaram alterações em responder aos EC ou EI, eles simplesmente falharam em iniciar frequentemente a resposta certa no tempo certo. Tal efeito pode ser resultado de uma deficiência no tônus de dopamina para estimular receptores dopaminérgicos estriatais do tipo D₁ da via direta, responsável pela desinibição de uma ação específica previamente reforçada (Alexander *et al.*, 1986; Da Cunha *et al.*, 2009c). Além disso, como a liberação fásica de dopamina depende de uma discrepância entre a expectativa e a obtenção de recompensa como consequência de uma ação, esses ratos podem ter apresentado uma incerteza maior sobre as consequências de suas ações, assim como em pacientes com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, os quais tipicamente preferem pequenas recompensas imediatas a grandes recompensas no futuro (Robbins, 2002; Frank *et al.*, 2007).

Os resultados do presente trabalho, também mostram que ratos com lesão unilateral no PPTg não apresentam prejuízos pronunciados de aprendizagem, enquanto ratos com lesão unilateral na SNc aprendem a tarefa mais lentamente. Esses dados sugerem que o PPTg e a SNc atuam sobre as mesmas propriedades funcionais, uma vez que lesões na SNc causam uma redução nos níveis estriatais de dopamina, mas isso não acontece com as lesões no PPTg. Isso pode ser observado pelo comportamento rotacional em resposta a apomorfina e pelos padrões de prejuízos no teste da esquiva (por exemplo, no ITC) que são diferentes após as lesões em uma ou outra estrutura. Entretanto, como essas duas estruturas estão trabalhando dentro de um mesmo domínio funcional, lesões unilaterais combinadas causam um profundo prejuízo sobre aprendizagem sem afetar o tempo de reação aos parâmetros que designam o desempenho motor.

Prejuízos de aprendizagem também têm sido observados em camundongos e macacos modelos da doença de Parkinson, assim como em pacientes com essa doença (Kimura, 1995; Salmon & Butters, 1995; Knowlton *et al.*, 1996b; Roncacci *et al.*, 1996; Hood *et al.*, 1999; Fernandez-Ruiz *et al.*, 2001; Grahm *et al.*, 2009b). Tais prejuízos,

também estão de acordo com o papel sugerido pela liberação fásica de dopamina em reforçar a aprendizagem (Da Cunha *et al.*, 2009c). Tal como discutido acima, há evidências de que a atividade fásica dos neurônios dopaminérgicos sinalize uma recompensa (Schultz, 1998) ou um estímulo aversivo (Horvitz, 2009; Matsumoto & Hikosaka, 2009b) não esperados. A ativação dos receptores dopaminérgicos reforça as sinapses córtico-estriatais entre neurônios pré- e pós-sinápticos da via direta, que são ativados ao mesmo tempo (potenciação de longa duração, LTP do inglês *long-term potentiation*), de forma que a reativação de tais neurônios seja facilitada frente à repetição do mesmo estímulo que desencadeou a recompensa. Por outro lado, quando uma memória leva a um erro (erro de predição) um novo aprendizado deve ocorrer. Nesse caso, a liberação de dopamina no estriado é reduzida e as sinapses entre os neurônios da via direta que a codificavam são enfraquecidas (depressão de longa duração, LTD do inglês *long-term depression*). Ao mesmo tempo, esses fenômenos ocorrem de maneira oposta nas sinapses córtico-estriatais da via indireta, ou seja, LTD durante a aprendizagem e LTP durante a extinção da memória (Calabresi *et al.*, 1992; Calabresi *et al.*, 2007; Wickens, 2009). Este mecanismo aumenta a probabilidade de que um estímulo (EC) pareado a uma recompensa ou punição (EI) possa desencadear a ação realizada para obter a recompensa ou esquivar da punição (Da Cunha *et al.*, 2009c). Podemos sugerir, portanto, um mecanismo similar para a aprendizagem da esQUIVA: o desencadeamento da execução de uma ação que interrompa um estímulo aversivo (EI) ou seu sinal de alerta (EC) deve aumentar com o treino em virtude de uma liberação fásica de dopamina. Recentemente, Watanabe (2007) mostrou que diferentes populações de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo dispararam em resposta a estímulos apetitivos e aversivos. A falha dos ratos com lesão unilateral no PPTg e na SNc na aprendizagem deste tipo de esQUIVA condicionada suportam essa explicação e sugerem que a resposta fásica dos neurônios dopaminérgicos podem estar sobre o controle do PPTg, como proposto por Kobayashi & Okada (2007).

O prejuízo de aprendizagem observado nos ratos com grandes lesões na SNc unilateral, comparados aos ratos com lesão unilateral no PPTg, não é surpreendente quando se trata de um sistema que depende da resposta fásica de dopamina para a plasticidade se os neurônios dopaminérgicos são modulados pelos neurônios do PPTg. Como mencionado anteriormente, é possível que o sinal de aprendizagem codificado por essa liberação de dopamina (Fiorillo *et al.*, 2008) seja desencadeado pelo PPTg (Okada *et al.*, 2009). Entretanto, não está claro o quanto este sinal depende

exclusivamente do PPTg ou se o PPTg é um dos sítios, entre outros, que modulam essa liberação fásica em situações específicas. Recentes achados apontam para o colículo superior (Redgrave *et al.*, 2008) e para a habenula lateral (Matsumoto & Hikosaka, 2007) como supostos candidatos a desencadear a liberação fásica de dopamina em resposta aos estímulos apetitivos ou aversivos, respectivamente. O efeito observado após as lesões unilaterais no PPTg e na SNc mostra que essas estruturas podem estar conectadas de maneira a permitir que o sinal da informação seja processado em ratos hemi-lesionados, entretanto isso é menos eficiente para os ratos do grupo SNc-unilateral porque a SNc está mais próxima do fim de uma cadeia de estruturas conectadas necessárias para a aprendizagem de CAR.

Portanto, a partir do presente estudo, é importante notar que, enquanto a lesão unilateral no PPTg não produziu um déficit na aprendizagem da esquivas ou um efeito motor (tanto no tempo de reação aos estímulos quanto nos ITCs), a adição de uma lesão unilateral na SNc (que por si só, dependendo da porcentagem de perda de neurônios, prejudica a aquisição dessa tarefa) aboliu qualquer sinal de aprendizagem, tornando evidente a importância da interação entre essas estruturas na aprendizagem de CAR.

Os resultados do presente trabalho sugerem que o PPTg e a SNc estão funcionalmente ligados e que suas conexões desempenham um papel importante na aquisição e expressão da resposta de esquivas condicionada. Esse envolvimento ocorre na mediação das respostas desencadeadas pela liberação da dopamina frente a estímulos ambientais salientes. Além disso, os resultados estão de acordo com dados da literatura que demonstram um papel central da dopamina nas tarefas associativas dependentes do estriado.

Evitar um evento aversivo pode ser aprendido e armazenado em forma de memória procedural, o que resulta em obter uma recompensa prazerosa ou evitar um estímulo indesejado. A comunicação indireta do PPTg ao estriado, via SNc, é importante para a aquisição e desempenho desse tipo de aprendizagem. Porém outros estudos são necessários para demonstrar seu papel na consolidação e expressão dessas respostas.

Com base nesses resultados, ressaltamos a importância da influência do PPTg como ferramenta terapêutica para o tratamento de doenças que acometem as respostas dependentes dos núcleos da base, tais como doença de Parkinson, Huntington e as desordens psiquiátricas como esquizofrenia e déficit de atenção e hiperatividade. Tal conhecimento se torna relevante para ajudar no aperfeiçoamento de técnicas já

utilizadas, como a estimulação profunda do PPTg em pacientes com DP (Mazzone *et al.*, 2005; Stefani *et al.*, 2007; Pierantozzi *et al.*, 2008), e no entendimento de possíveis efeitos colaterais cognitivos que possam surgir em decorrência dessas terapias

6. Conclusão

Nossos resultados permitem concluir que existe uma conexão funcional entre o PPTg e a SNc e que tais conexões, principalmente as ipsilaterais, desempenham um papel importante na aprendizagem condicionada de esquiva (CAR).

7. Referências Bibliográficas

- Albin, R.L., Young, A.B. & Penney, J.B. (1989) The Functional-Anatomy of Basal Ganglia Disorders. *Trends in Neuroscience*, **12**, 366-375.
- Alderson, H.L., Brown, V.J., Latimer, M.P., Brasted, P.J., Robertson, A.H. & Winn, P. (2002) Excitotoxic lesions of the pedunculo pontine tegmental nucleus in rats: an examination of the perception of reward strength measured by responding on a progressive ratio schedule of reinforcement. *Neuroscience*, **112**, 417-425.
- Alderson, H.L., Latimer, M.P., Blaha, C.D., Phillips, A.G. & Winn, P. (2004) An examination of d-amphetamine self-administration in pedunculo pontine tegmental nucleus-lesioned rats. *Neuroscience*, **125**, 349-358.
- Alderson, H.L. & Winn, P. (2005) *The pedunculo pontine and reinforcement*. Springer, New York.
- Alexander, G.E., DeLong, M.R. & Strick, P.L. (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annual Review of Neuroscience*, **9**, 357-381.
- Beal, M.F. (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Natural Review of Neuroscience*, **2**, 325-332.
- Beninato, M. & Spencer, R.F. (1987) A cholinergic projection to the rat substantia-nigra from the pedunculo pontine tegmental nucleus. *Brain Research*, **412**, 169-174.
- Beninato, M. & Spencer, R.F. (1988) The Cholinergic Innervation of the Rat Substantia Nigra - a Light and Electron-Microscopic Immunohistochemical Study. *Experimental Brain Research*, **72**, 178-184.
- Betarbet, R., Sherer, T.B. & Greenamyre, J.T. (2002) Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays*, **24**, 308-318.

- Bevan, M.D. & Bolam, J.P. (1995) Cholinergic, Gabaergic, and Glutamate-Enriched Inputs from the Mesopontine Tegmentum to the Subthalamic Nucleus in the Rat. *Journal Neuroscience*, **15**, 7105-7120.
- Bolles, R.C. (1970) Species-Specific Defense Reactions and Avoidance Learning. *Psychol. Rev.*, **77**, 32-48.
- Breit, S., Bouali-Benazzouz, R., Benabid, A.L. & Benazzouz, A. (2001) Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway induces an increase of neuronal activity of the pedunclopontine nucleus, which is reversed by the lesion of the subthalamic nucleus in the rat. *European Journal of Neuroscience*, **14**, 1833-1842.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A. & Di Filippo, M. (2007) Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends in Neuroscience*, **30**, 211-219.
- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N.B. & Bernardi, G. (1992) Long-term Potentiation in the Striatum is Unmasked by Removing the Voltage-dependent Magnesium Block of NMDA Receptor Channels. *European Journal of Neuroscience*, **4**, 929-935.
- Carbon, M. & Marie, R.M. (2003) Functional imaging of cognition in Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology*, **16**, 475-480.
- Carlson, J.D., Pearlstein, R.D., Buchholz, J., Iacono, R.P. & Maeda, G. (1999) Regional metabolic changes in the pedunclopontine nucleus of unilateral 6-hydroxydopamine Parkinson's model rats. *Brain Research*, **828**, 12-19.
- Clarke, P.B.S., Hommer, D.W., Pert, A. & Skirboll, L.R. (1987) Innervation of substantia nigra neurons by cholinergic afferents from pedunclopontine nucleus in the rat - neuroanatomical and electrophysiological evidence. *Neuroscience*, **23**, 1011-1019.

- Cohen, G., Pasik, P., Cohen, B., Leist, A., Mytilineou, C. & Yahr, M.D. (1984) Pargyline and Deprenyl Prevent the Neurotoxicity of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (Mptp) in Monkeys. *European Journal of Pharmacology*, **106**, 209-210.
- Colombo, P., Davis HP, Bolpe BT (1989) Allocentric spatial and tactile memory impairments in rats with dorsal caudate lesions are affected by preoperative behavioral training. *Behavioural Neuroscience*, **103**, 1242-1250.
- Corrigall, W.A., Coen, K.M., Zhang, J. & Adamson, K.L. (2001) GABA mechanisms in the pedunclopontine tegmental nucleus influence particular aspects of nicotine self-administration selectively in the rat. *Psychopharmacology*, **158**, 189-197.
- Corrigall, W.A., Coen, K.M., Zhang, J. & Adamson, K.L. (2002) Pharmacological manipulations of the pedunclopontine tegmental nucleus in the rat reduce self-administration of both nicotine and cocaine. *Psychopharmacology*, **160**, 198-205.
- Da Cunha, C. (2006) Cognitive disorders in Parkinson's disease. In Brandão, M.L., Graeff, F.G. (eds) *Neurobiology of Mental Disorders*. Nova Publishers, New York, pp. 221-140.
- Da Cunha, C., Angelucci, M.E.M., Canteras, N.S., Wonnacott, S. & Takahashi, R.N. (2002) The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **22**, 227-237.
- Da Cunha, C., Gevaerd, M.S., Vital, M., Miyoshi, E., Andreatini, R., Silveira, R., Takahashi, R.N. & Canteras, N.S. (2001) Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behavioural Brain Research*, **124**, 9-18.

- Da Cunha, C., Wietzikoski, E.C., Bortolanza, M., Dombrowski, P., Santos, L.M., Boschen, S.L., Miyoshi, E., Vital, M.A.B.F., Boergen-Lacerda, R. & Andreatini, R. (2009a) Non-motor function of the midbrain dopaminergic neurons. In Di Giovanni, G., Di Matteo, V., Esposito, E. (eds) *Birth, Life and Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra*. Springer-Verlag/Wien, New York.
- Da Cunha, C., Wietzikoski, E.C., Dombrowski, P., Bortolanza, M., Santos, L.M., Boschen, S.L. & Miyoshi, E. (2009b) Learning processing in the basal ganglia: A mosaic of broken mirrors. *Behavioural Brain Research*, **199**, 157-170.
- Da Cunha, C., Wietzikoski, E.C., Dombrowski, P., Santos, L.M., Bortolanza, M., Boschen, S.L. & Miyoshi, E. (2009c) Learning processing in the basal ganglia: A mosaic of broken mirrors. *Behavioural Brain Research*, **199**, 156-169.
- Da Cunha, C., Wietzikoski, S., Wietzikoski, E.C., Miyoshi, E., Ferro, M.M., Anselmo-Franci, J.A. & Canteras, N.S. (2003) Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. *Neurobiology of Learning and Memory*, **79**, 236-242.
- Da Cunha, C., Wietzikoski, S., Wietzikoski, E.C., Silva, M.H.C., Chandler, J., Ferro, M.M., Andreatini, R. & Canteras, N.S. (2007) Pre-training to find a hidden platform in the Morris water maze can compensate for a deficit to find a cued platform in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Learning and Memory*, **87**, 451-463.
- Dauer, W. & Przedborski, S. (2003) Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*, **39**, 889-909.
- Del Guante, M.A.D., Rivas, M., Prado-Alcala, R.A. & Quirarte, G.L. (2004) Amnesia produced by pre-training infusion of serotonin into the substantia nigra. *Neuroreport*, **15**, 2527-2529.

- Di Giovanni, G. & Shi, W.X. (2009) Effects of Scopolamine on Dopamine Neurons in the Substantia Nigra: Role of the Pedunculopontine Tegmental Nucleus. *Synapse*, **63**, 673-680.
- Dubois, B. & Pillon, B. (1997) Cognitive deficits in Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, **244**, 2-8.
- Eichenbaum, H. (2008) *Learning & Memory*. Norton & Company, New York London.
- Eichenbaum, H.a.C., N. J. (2001) *From conditioning to conscious recollection: memory systems of the brain*. Oxford University Press, New York.
- Fahn, S. & Sulzer, D. (2004) Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson Disease. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, **1**, 139-154.
- Fallon, J.F.L., S.E. (1985) Substância nigra,. In Paxinos, G. (ed) *The rat nervous system*. Academic press, Australia.
- Fernandez-Ruiz, J., Wang, J., Aigner, T.G. & Mishkin, M. (2001) Visual habit formation in monkeys with neurotoxic lesions of the ventrocaudal neostriatum. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **98**, 4196-4201.
- Ferro, M.M., Bellissimo, M.I., Anselmo-Franci, J.A., Angellucci, M.E.M., Canteras, N.S. & Da Cunha, C. (2005) Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. *Journal of Neuroscience Methods*, **148**, 78-87.
- Fiorillo, C.D., Newsome, W.T. & Schultz, W. (2008) The temporal precision of reward prediction in dopamine neurons. *Nature Neuroscience*, **11**, 966-973.

- Fiorillo, C.D., Tobler, P.N. & Schultz, W. (2003) Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons. *Science*, **299**, 1898-1902.
- Floresco, S.B., West, A.R., Ash, B., Moore, H. & Grace, A.A. (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nature Neuroscience*, **6**, 968-973.
- Ford, B., Holmes, C.J., Mainville, L. & Jones, B.E. (1995) Gabaergic Neurons in the Rat Pontomesencephalic Tegmentum - Codistribution with Cholinergic and Other Tegmental Neurons Projecting to the Posterior Lateral Hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology*, **363**, 177-196.
- Frank, M.J., Santamaria, A., O'Reilly, R.C. & Willcutt, E. (2007) Testing computational models of dopamine and noradrenaline dysfunction in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology*, **32**, 1583-1599.
- Fujimoto, K., Ikeguchi, K. & Yoshida, M. (1992) Impaired Acquisition, Preserved Retention and Retrieval of Avoidance-Behavior after Destruction of Pedunculopontine Nucleus Areas in the Rat. *Neuroscience Research*, **13**, 43-51.
- Futami, T., Takakusaki, K. & Kitai, S.T. (1995) Glutamatergic and Cholinergic Inputs from the Pedunculopontine Tegmental Nucleus to Dopamine Neurons in the Substantia-Nigra Pars Compacta. *Neuroscience Research*, **21**, 331-342.
- Garcia-Rill, E. (1991) The pedunculopontine nucleus. *Progress in Neurobiology*, **36**, 363-389.
- Gerlach, M. & Riederer, P. (1996) Animal models of Parkinson's disease: An empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *Journal of Neural Transmission*, **103**, 987-1041.

- Gevaerd, M.S., Miyoshi, E., Silveira, R., Canteras, N.S., Takahashi, R.N. & Da Cunha, C. (2001a) L-dopa restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, **4**, 361-370.
- Gevaerd, M.S., Takahashi, R.N., Silveira, R. & Da Cunha, C. (2001b) Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. *Brain Research Bulletin*, **55**, 101-106.
- Gould, E., Woolf, N.J. & Butcher, L.L. (1989) Cholinergic Projections to the Substantia Nigra from the Pedunculopontine and Laterodorsal Tegmental Nuclei. *Neuroscience*, **28**, 611-623.
- Grahn, J.A., Parkinson, J.A. & Owen, A.M. (2009a) The role of the basal ganglia in learning and memory: neuropsychological studies. *Behavioural Brain Research*, **199**, 53-60.
- Grahn, J.A., Parkinson, J.A. & Owen, A.M. (2009b) The role of the basal ganglia in learning and memory: neuropsychological studies. *Behavioural Brain Research*, **199**, 53-60.
- Gulley, J.M. & Rebec, G.V. (1999) Modulatory effects of ascorbate, alone or with haloperidol, on a lever-release conditioned avoidance response task. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **63**, 125-129.
- Halbach, O.B., Schober, A. & Kriegstein, J. (2004) Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, **73**, 151-177.
- Hawkes, C.H., Del Tredici, K. & Braak, H. (2010) A timeline for Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, **16**, 79-84.

- Hirsch, E.C., Graybiel, A.M., Duyckaerts, C. & Javoyagid, F. (1987) Neuronal Loss in the Pedunculopontine Tegmental Nucleus in Parkinson Disease and in Progressive Supranuclear Palsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 5976-5980.
- Honda, T. & Semba, K. (1995) An Ultrastructural-Study of Cholinergic and Noncholinergic Neurons in the Laterodorsal and Pedunculopontine Tegmental Nuclei in the Rat. *Neuroscience*, **68**, 837-853.
- Hood, K.L., Postle, B.R. & Corkin, S. (1999) An evaluation of the concurrent discrimination task as a measure of habit learning: performance of amnesic subjects. *Neuropsychology*, **37**, 1375-1386.
- Horvitz, J.C. (2009) Stimulus-response and response-outcome learning mechanisms in the striatum. *Behavioural Brain Research*, **199**, 129-140.
- Inglis, W.L., Dunbar, J.S. & Winn, P. (1994) Outflow from the nucleus accumbens to the pedunculopontine tegmental nucleus: a dissociation between locomotor activity and the acquisition of responding for conditioned reinforcement stimulated by amphetamine. *Neuroscience*, **62**, 51-64.
- Inglis, W.L., Olmstead, M.C. & Robbins, T.W. (2000) Pedunculopontine tegmental nucleus lesions impair stimulus-reward learning in autoshaping and conditioned reinforcement paradigms. *Behavioral Neuroscience*, **114**, 285-294.
- Izquierdo, I. (2002) *Memória*. Artmed, Porto Alegre.
- Jellinger, K. (1988) The pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, **51**, 540- 543.
- Jenner, P. (2003) The contribution of the MPTP-treated primate model to the development of new treatment strategies for Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, **9**, 131-137.

- Kahle, P.J., Haass, C., Kretschmar, H.A. & Neumann, M. (2002) Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases. *Journal of Neurochemistry*, **82**, 449-457.
- Kasashima, S. & Oda, Y. (2003) Cholinergic neuronal loss in the basal forebrain and mesopontine tegmentum of progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Acta Neuropathologica*, **105**, 117-124.
- Keating, G.L. & Winn, P. (2002) Examination of the role of the pedunclopontine tegmental nucleus in radial maze tasks with or without a delay. *Neuroscience*, **112**, 687-696.
- Kimura, M. (1995) Role of basal ganglia in behavioral learning. *Neuroscience Research*, **22**, 353-358.
- Kitai, S.T., Shepard, P.D., Callaway, J.C. & Scroggs, R. (1999) Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns. *Current Opinion in Neurobiology*, **9**, 690-697.
- Knowlton, B.J. (2002) The role of the basal ganglia in learning and memory. In Squire, L.R.S., D. L. (ed) *Neuropsychology of memory*. Guilford Press, New York, pp. 143-153.
- Knowlton, B.J., Mangels, J.A. & Squire, L.R. (1996a) A neostriatal habit learning system in humans. *Science*, **273**, 1399-1402.
- Knowlton, B.J., Squire, L.R., Paulsen, J.S., Swerdlow, N.R., Swenson, M. & Butters, N. (1996b) Dissociations within nondeclarative memory in Huntington's disease. *Neuropsychology*, **10**, 538-548.
- Kobayashi, Y. & Okada, K.C. (2007) Reward prediction error computation in the pedunclopontine tegmental nucleus neurons. *Reward and Decision Making in Corticobasal Ganglia Networks*, **1104**, 310-323.

- Lavoie, B. & Parent, A. (1994a) Pedunculo pontine Nucleus in the Squirrel-Monkey - Projections to the Basal Ganglia as Revealed by Anterograde Tract-Tracing Methods. *The Journal of Comparative Neurology*, **344**, 210-231.
- Lavoie, B. & Parent, A. (1994b) Pedunculo pontine Nucleus in the Squirrel-Monkey - Cholinergic and Glutamatergic Projections to the Substantia-Nigra. *J. Comp. Neurol.*, **344**, 232-241.
- Lepore, M. & Franklin, K.B.J. (1996) N-methyl-d-aspartate lesions of the pedunculo pontine nucleus block acquisition and impair maintenance of responding reinforced with brain stimulation. *Neuroscience*, **71**, 147-155.
- Lester, D.B., Rogers, T.D. & Blaha, C.D. (2010) Acetylcholine-Dopamine Interactions in the Pathophysiology and Treatment of CNS Disorders. *CNS Neuroscience Therapeutics*, **00**, 1-26.
- Lokwan, S.J., Overton, P.G., Berry, M.S. & Clark, D. (1999) Stimulation of the pedunculo pontine tegmental nucleus in the rat produces burst firing in A9 dopaminergic neurons. *Neuroscience* **92**, 245-254.
- Matsumoto, M. & Hikosaka, O. (2007) Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature*, **447**, 1111-1115.
- Matsumoto, M. & Hikosaka, O. (2009a) Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nature Neuroscience*, **12**, 77-84.
- Matsumoto, M. & Hikosaka, O. (2009b) Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature*, **459**, 838-842.
- Mazzone, P., Lozano, A., Stanzione, P., Galati, S., Scarnati, E., Peppe, A. & Stefani, A. (2005) Implantation of human pedunculo pontine nucleus: a safe and clinically relevant target in Parkinson's disease. *Neuroreport*, **16**, 1877-1881.

- McDonald, R.J. & White, N.M. (1994) Parallel Information-Processing in the Water Maze - Evidence for Independent Memory-Systems Involving Dorsal Striatum and Hippocampus. *Behavioral and Neural Biology*, **61**, 260-270.
- Mena-Segovia, J., Bolam, J.P. & Magill, P.J. (2004 a) Pedunculopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *Trends Neuroscience*, **27**, 585-588.
- Mena-Segovia, J., Favila, R. & Giordano, M. (2004 b) Long-term effects of striatal lesions on c-Fos immunoreactivity in the pedunculopontine nucleus. *European Journal of Neuroscience*, **20**, 2367-2376.
- Mena-Segovia, P., Winn, P. & Bolam, J.P. (2008) Cholinergic modulation of midbrain dopaminergic systems. *Brain Research Reviews*, **58**, 265-271.
- Miyoshi, E., Wietzikoski, S., Camplessei, M., Silveira, R., Takahashi, R.N. & Da Cunha, C. (2002) Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. *Brain Research Bulletin*, **58**, 41-47.
- Nambu, A., Tokuno, H., Takada, M. (2002) Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neuroscience Research*, 111-117.
- Nicola, S.M. (2007) The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology*, **191**, 521-550.
- Okada, K., Toyama, K., Inoue, Y., Isa, T. & Kobayashi, Y. (2009) Different Pedunculopontine Tegmental Neurons Signal Predicted and Actual Task Rewards. *Journal of Neuroscience*, **29**, 4858-4870.
- Olmstead, M.C. & Franklin, K.B.J. (1994) Lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus block drug-induced reinforcement but not amphetamine-induced locomotion. *Brain Research*, **638**, 29-35.

- Olmstead, M.C., Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (1998) Basal forebrain cholinergic lesions enhance conditioned approach responses to stimuli predictive of food. *Behavioral Neuroscience*, **112**, 611-629.
- Orieux, G., Francois, C., Feger, J., Yelnik, J., Vila, M., Ruberg, M., Agid, Y. & Hirsch, E.C. (2000) Metabolic activity of excitatory parafascicular and pedunculo-pontine inputs to the subthalamic nucleus in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, **97**, 79-88.
- Packard, M.G. & Knowlton, B.J. (2002) Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.*, **25**, 563-593.
- Packard, M.G. & McGaugh, J.L. (1992) Double Dissociation of Fornix and Caudate-Nucleus Lesions on Acquisition of 2 Water Maze Tasks - Further Evidence for Multiple Memory-Systems. *Behavioral Neuroscience*, **106**, 439-446.
- Packard, M.G. & White, N.M. (1990) Lesions of the Caudate-Nucleus Selectively Impair Reference Memory Acquisition in the Radial Maze. *Behavioral and Neural Biology*, **53**, 39-50.
- Pahapill, P.A. & Lozano, A.M. (2000) The pedunculo-pontine nucleus and Parkinson's disease. *Brain*, **123**, 1767-1783.
- Pan, W.X. & Hyland, B.I. (2005) Pedunculo-pontine tegmental nucleus controls conditioned responses of midbrain dopamine neurons in behaving rats. *Journal of Neuroscience*, **25**, 4725-4732.
- Parent, A. & Hazrati, L.N. (1995a) Functional-anatomy of the basal ganglia .1. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research Reviews*, **20**, 91-127.
- Parent, A. & Hazrati, L.N. (1995b) Functional-anatomy of the basal ganglia .2. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Research Reviews*, **20**, 128-154.

- Parkinson, J.A., Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (2000) Dissociable roles of the central and basolateral amygdala in appetitive emotional learning. *European Journal of Neuroscience*, **12**, 405-413.
- Pierantozzi, M., Palmieri, M.G., Galati, S., Stanzione, P., Peppe, A., Tropepi, D., Brusa, L., Pisani, A., Moschella, V., Marciani, M.G., Mazzone, P. & Stefani, A. (2008) Pedunclopontine nucleus deep brain stimulation changes spinal cord excitability in Parkinson's disease patients. *Journal of Neural Transmission*, **115**, 731-735.
- Poldrack, R.A. & Packard, M.G. (2003) Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia*, **41**, 245-251.
- Potashkin, J.A., Kang, U.J., Loomis, P.A., Jodelka, F.M., Ding, Y.M. & Meredith, G.E. (2007) MPTP administration in mice changes the ratio of splice isoforms of fosB and rgs9. *Brain Research*, **1182**, 1-10.
- Przedborski, S. & Ischiropoulos, H. (2005) Reactive oxygen and nitrogen species: Weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, **7**, 685-693.
- Racht-Delatour, B.V. & El Massioui, N. (1999) Rule-based learning impairment in rats with lesions to the dorsal striatum. *Neurobiology of Learning and Memory*, **72**, 47-61.
- Redgrave, P., Gurney, K. & Reynolds, J. (2008) What is reinforced by phasic dopamine signals? *Brain Research Reviews*, **58**, 322-339.
- Robbins, T.W. (2002) The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology*, **163**, 362-380.

- Rojo, A.I., Montero, C., Salazar, M., Close, R.M., Fernandez-Ruiz, J., Sanchez-Gonzalez, M.A., de Sagarra, M.R., Jackson-Lewis, V., Cavada, C. & Cuadrado, A. (2006) Persistent penetration of MPTP through the nasal route induces Parkinson's disease in mice. *European Journal of Neuroscience*, **24**, 1874-1884.
- Roncacci, S., Troisi, E., Carlesimo, G.A., Nocentini, U. & Caltagirone, C. (1996) Implicit memory in Parkinsonian patients: Evidence for deficient skill learning. *European Neurology*, **36**, 154-159.
- Rostron, C.L., Farquhar, M.J., Latimer, M.P. & Winn, P. (2008) The pedunculopontine tegmental nucleus and the nucleus basalis magnocellularis: Do both have a role in sustained attention? *Bmc Neuroscience*, **9**.
- Salmon, D.P. & Butters, N. (1995) Neurobiology of skill and habit learning. *Current Opinion in Neurobiology*, **5**, 184-190.
- Scarnati, E., Campana, E. & Pacitti, C. (1984) Pedunculopontine-Evoked Excitation of Substantia Nigra Neurons in the Rat. *Brain Research*, **304**, 351-361.
- Scarnati, E., Proia, A., Campana, E. & Pacitti, C. (1986) A Microiontophoretic Study on the Nature of the Putative Synaptic Neurotransmitter Involved in the Pedunculopontine-Substantia Nigra Pars Compacta Excitatory Pathway of the Rat. *Experimental Brain Research*, **62**, 470-478.
- Schultz, W. (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. (vol 80, pg 1, 1998). *Journal of Neurophysiology*, **80**, U32-U32.
- Scoville, W.B. & Milner, B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, **20**, 11-21.
- Semba, K., Reiner, P.B., McGeer, E.G. & Fibiger, H.C. (1988) Brainstem afferents to the magnocellular basal forebrain studied by axonal transport immunohistochemistry, and electrophysiology in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, **267**, 433-453.

- Sesack, R.S. & Grace, A.A. (2010) Cortico-Basal Ganglia Reward Network: Microcircuitry. *Neuropsychopharmacology*, **35**, 27-47.
- Sonsalla, P.K., Giovanni, A., Sieber, B.A., Delledonne, K. & Manzino, L. (1992) Characteristics of Dopaminergic Neurotoxicity Produced by Mptp and Methamphetamine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **648**, 229-238.
- Spann, B.M. & Grofova, I. (1992) Cholinergic and Noncholinergic Neurons in the Rat Pedunculopontine Tegmental Nucleus. *Anatomy and Embryology*, **186**, 215-227.
- Squire, L.R. (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, **99**, 195-231.
- Squire, L.R. (2004) Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, **82**, 171-177.
- Squire, L.R. & Kandel, E.R. (2003) *Memória: da mente às moléculas*. Artmed, Porto Alegre.
- Squire, L.R., Stark, C.E. & Clark, R.E. (2004) The medialtemporal lobe. *Annual Review of Neuroscience*, **27**, 279-306.
- Squire, L.R.K., B; Musen G. (1993) The structure and organization of memory. *Annual Review of Psychology* **44**, 453-495.
- Staal, R.G.W. & Sonsalla, P.K. (2000) Inhibition of brain vesicular monoamine transporter (VMAT2) enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in vivo in rat striata. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **293**, 336-342.
- Stefani, A., Lozano, A.M., Peppe, A., Stanzione, P., Galati, S., Tropepi, D., Pierantozzi, M., Brusa, L., Scarnati, E. & Mazzone, P. (2007) Bilateral deep brain stimulation of the pedunculopontine and subthalamic nuclei in severe Parkinson's disease. *Brain*, **130**, 1596-1607.

- Storey, E., Hyman, B.T., Jenkins, B., Brouillet, E., Miller, J.M., Rosen, B.R. & Beal, M.F. (1992) 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Produces Excitotoxic Lesions in Rat Striatum as a Result of Impairment of Oxidative-Metabolism. *Journal of Neurochemistry*, **58**, 1975-1978.
- Takakusaki, K., Shiroyama, T., Yamamoto, T. & Kitai, S.T. (1996) Cholinergic and noncholinergic tegmental pedunculopontine projection neurons in rats revealed by intracellular labeling. *Journal of Comparative Neurology*, **371**, 345-361.
- Taylor, C.L., Kozak, R., Latimer, M.P. & Winn, P. (2004) Effects of changing reward on performance of the delayed spatial win-shift radial maze task in pedunculopontine tegmental nucleus lesioned rats. *Behavioural Brain Research*, **153**, 431-438.
- Uc, E.Y., Skinner, R.D., Rodnitzky, R.L. & Garcia-Rill, E. (2003) The midlatency auditory evoked potential P50 is abnormal in Huntington's disease. *Journal of Neurological Science*, **212**, 1-5.
- Vincent, S.R. & Kimura, H. (1992) Histochemical Mapping of Nitric-Oxide Synthase in the Rat-Brain. *Neuroscience*, **46**, 755-784.
- Voermans, N.C., Petersson, K.M., Daudey, L., Weber, B., van Spaendonck, K.P., Kremer, H.P.H. & Fernandez, G. (2004) Interaction between the human hippocampus and the caudate nucleus during route recognition. *Neuron*, **43**, 427-435.
- Warren, M.F., Serby, M.J. & Roane, D.M. (2008) The Effects of Testosterone on Cognition in Elderly Men: A Review. *CNS Spectrum*, **13**, 887-897.
- Watanabe, M. (2007) Role of anticipated reward in cognitive behavioral control. *Current Opinion in Neurobiology*, **17**, 213-219.
- Wickens, J.R. (2009) Synaptic plasticity in the basal ganglia. *Behavioural Brain Research*, **199**, 119-128.

- Wilson, D.I.G., MacLaren, D.A.A. & Winn, P. (2009) Bar pressing for food: differential consequences of lesions to the anterior versus posterior pedunculopontine. *European Journal of Neuroscience*, **30**, 504-513.
- Winn, P. (2006) How best to consider the structure and function of the pedunculopontine tegmental nucleus: Evidence from animal studies. *Journal of Neurological Science*, **248**, 234-250.
- Yanagisawa, N. (2006) Natural history of Parkinson's disease: From dopamine to multiple system involvement. *Parkinsonism and Related Disorders*, **12**, S40-S46.
- Yeomans, J.S., Mathur, A. & Tampakeras, M. (1993) Rewarding brain stimulation role of tegmental cholinergic neurons that activate dopamine neurons. *Behavioral Neuroscience*, **107**, 1077-1087.

Anexo 1. Artigo Científico submetido à publicação na revista *Neurobiology of Learning and Memory*.

Functional disconnection of the substantia nigra pars compacta from the pedunculopontine nucleus impairs learning of a conditioned avoidance task

Mariza Bortolanza, Evellyn C. Wietzikoski, Suelen L. Boschen, Patricia A.

Dombrowski, Mary Latimer *, Duncan A.A. MacLaren *, Philip Winn **, Claudio Da Cunha***

Laboratorio de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Parana (UFPR), C.P. 19031, 81531-980 Curitiba, Brazil.

*School of Psychology, University of St Andrews, St Mary's Quad, South Street, Fife KY16 9JP, Scotland

**Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Science, University of Strathclyde, 27 Taylor Street, Glasgow G4 0NR, Scotland

***Correspondente to Claudio Da Cunha, Universidade Federal do Paraná, C.P.:19.031, 81.531-980 Curitiba PR Brazil, Phone: + 55 41 3361-1717, Fax: + 55 41 3266-2042, E-mail: dacunha62@uol.com.br

Abstract

The pedunculopontine tegmental nucleus (PPTg) targets nuclei in the basal ganglia, including the substantia nigra pars compacta (SNc), in which neuronal loss occurs in Parkinson's disease a condition in which patients show cognitive as well as motor disturbances. Partial loss and functional abnormalities of neurons in the PPTg are also associated with Parkinson's disease. We hypothesized that the interaction of PPTg and SNc might be important for cognitive impairments and so investigated whether disrupting the connections between the PPTg and SNc impaired learning of a conditioned avoidance response (CAR) by male Wistar rats. The following groups were tested: PPTg unilateral; SNc unilateral; PPTg-SNc ipsilateral (ipsilateral lesions in PPTg and SNc); PPTg-SNc contralateral (contralateral lesions in PPTg and SNc); sham lesions (of each type). SNc lesions were made with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine HCl (MPTP, 0.6 μ moles); PPTg lesions with ibotenate (24 nmoles). After recovery, all rats underwent 50-trial sessions of 2-way active avoidance conditioning for 3 consecutive days. Rats with unilateral lesions in PPTg or SNc learnt this, however rats with contralateral (but not ipsilateral) combined lesions in both structures presented no sign of learning. This effect was not likely to be due to sensorimotor impairment because lesions did not affect reaction time to the tone or footshock during conditioning. However, an increased number of non-responses were observed in the rats with contralateral lesions. The results support the hypothesis that a functional interaction between PPTg and SNc is needed for CAR learning and performance.

Keywords: active avoidance, Parkinson, basal ganglia, dopamine

Introduction

The pedunculopontine tegmental nucleus (PPTg) is now accepted as one of the basal ganglia family of structures, being intimately connected with many parts of the basal ganglia, such as the globus pallidus, subthalamic nucleus and substantia nigra pars compacta (SNc). Understanding the connection between the PPTg and SNc is particularly important because they are implicated in the pathology of Parkinson's disease. Parkinson's disease patients present motor impairments, but also have cognitive deficits that appear in advance of the motor impairments (Carbon and Marie, 2003; Dubois and Pillon, 1997; Juri and Chana, 2006). This is not surprising, given that the basal ganglia play a role in action selection and in the learning of action-outcome associations and stimulus-response habits (Balleine, Liljeholm, and Ostlund, 2009; Cohen and Frank, 2009; Da Cunha, Wietzikoski, Dombrowski, Santos, Bortolanza, Boschen, and Miyoshi, 2009; Izquierdo, Bevilaqua, Rossato, Bonini, Da Silva, Medina, and Cammarota, 2006; Packard and McGaugh, 1992; 1996; White, 2009; Yin and Knowlton, 2006). Critical to such associations is the phasic release of dopamine (DA) in the striatum, which selectively reinforces corticostriatal synaptic activity. Striatal DA is provided by neurons in the SNc and adjacent ventral tegmental area (VTA) and, because the PPTg is a source of excitatory input to these, it is possible that the PPTg provides information that allows computation of a DA-mediated reward prediction error signal critical to the striatal operations (Mena-Segovia, Winn, and Bolam, 2008; Okada, Toyama, Inoue, Isa, and Kobayashi, 2009; Pan and Hyland, 2005). In this paper we attempt to determine whether the interaction between PPTg and SNc is important for the formation of associations – for learning.

Stimulus-response-outcome association can be modeled by the 2-way active avoidance task. It is a conditioned avoidance task (CAR) in which rats learn to

anticipate an imminent footshock (unconditioned stimulus: US) and avoid it by an instrumental response after the presentation of a warning stimulus (conditioned stimulus: CS). In the present study we tested whether a functional interaction between the PPTg and SNc is necessary for learning this. The disconnection of these structures was achieved by combined lesions, based on the premise that if two structures are serially connected, their function can be impaired by combined hemi-lesions of these structures on opposite sides of the brain (when those hemi-lesions – in this case unilateral lesion of either SNc or PPTg – are independently ineffective) (Parkinson, Robbins, and Everitt, 2000). In the present study, impairment is expected after combined unilateral lesion of the PPTg and SNc in different hemispheres because they are mostly ipsilaterally connected (Beninato and Spencer, 1987; 1988; Clarke, Hommer, Pert, and Skirboll, 1987; Gould, Woolf, and Butcher, 1989; Mena-Segovia et al., 2008; Woolf and Butcher, 1986). In view of the reciprocal connections between the PPTg and the SNc (Beninato and Spencer, 1987; 1988; Clarke et al., 1987; Gould et al., 1989) and that they are needed for learning of stimulus-response-outcome associations (Da Cunha et al., 2009; Zokoll, Klump, and Langemann, 2008), we predicted that animals bearing combined unilateral lesion of both structures (in the different hemispheres) would be impaired to learn this CAR task.

Material and Methods

Subjects and housing

Adult male Wistar rats from the colony of the Universidade Federal do Parana, weighing 280-310 g at the beginning of the experiments were used. The animals were maintained in a temperature-controlled room (22 ± 2 °C) on a 12/12 h dark/light cycle (lights on at 7:00 a.m.) with food and water available ad libitum. All surgical

interventions were done under appropriate anaesthesia and efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering in the experimental procedures adopted for the *in vivo* studies. These procedures were previously approved by the Animal Care and Use Committee of the Universidade Federal do Parana (protocol 195) and were in compliance with the guidelines with the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

A total of 78 animals were used in these experiments. Data from 35 of these was included in this study; the others died (28 rats) before completing the experiments, or were excluded according to histological (12 rats) or turning behaviour criteria (3 rats). Surgical interventions using MPTP or excitotoxins in SNc and PPTg are known to be associated with relatively high mortality rates, both during and after surgery (Ferro et al, 2005; Wilson et al, 2009). The combination of lesions used here reflects this, with the combined PPTg and SNc lesions accounting for 68% of the fatalities; note that sham lesions were not associated with this high mortality rate.

Surgery

Surgery was conducted 21 days before the start of behavioural experiments. All the rats received atropine sulfate (0.4 mg/kg, i.p.) to suppress salivation, penicillin G-procaine (20,000U in 0.1 ml, i.m.), and were anesthetized with 3 ml/kg equithesin (1% sodium thiopental, 4.25% chloral hydrate, 2.13% magnesium sulfate, 42.8% propylene glycol, and 3.7% ethanol in water, i.p.).

The animals were randomly assigned to one of 5 groups: PPTg unilateral (unilaterally lesioned in the PPTg); SNc unilateral (unilaterally lesioned in the SNc); PPTg-SNc ipsilateral (ipsilaterally lesioned in the PPTg and SNc); PPTg-SNc

contralateral (contralaterally lesioned in the PPTg and SNc). Sham lesions of each type were made. The rats were placed in a stereotaxic frame (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) with the incisor bar set 3.3 mm below the interaural line and ibotenic acid (Tocris-Cookson Ltd, Bristol, UK; 24 nmoles in 0.2 μ l 0.12 M phosphate buffer, pH 7.4) or 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine HCl (MPTP, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; 0.6 μ moles in 1 μ l saline) was infused into the PPTg or SNc, respectively. The following coordinates were used (adapted from the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (2005)): PPTg: anteroposterior (AP) +0.8 mm from the interaural line; mediolateral (ML) \pm 1.8 mm from midline; dorsoventral (DV) -6.4 mm from the skull surface (SK); MPTP: AP +3.9 mm from the interaural line; ML \pm 2.1 mm; DV -7.7 mm from SK. The sham rats received the vehicle of one of the neurotoxins, as appropriate to the structure concerned. Ibotenic acid was infused into the PPTg by manual pressure ejection from glass micropipettes (35 μ m external tip diameter), left *in situ* for 5 min after infusion to allow for diffusion away from the tip. Rats with lesions in both hemispheres received 2 separate unilateral operations, 7 days apart. The MPTP was infused into the SNc at a rate of 0.25 μ l/min by a 30-gauge needle connected to a microinfusion pump (Insight, Ribeirao Preto, Brazil). The needle remained in place for an additional 2 min to maximize diffusion of the solution. Rats also received 3 i.p. injections of 120 mg/kg acetaldehyde 15 min before, at the beginning and 15 min after surgery to increase the effectiveness of the neurotoxin (Zuddas, Corsini, Schinelli, Johannessen, Diporzio, and Kopin, 1989). After surgery, all rats were allowed to recover from anaesthesia in a temperature controlled chamber and then placed back into their home cages.

2-way active avoidance

The 2-way active avoidance apparatus was an automated 31 x 33 x 56 cm shuttle-box (Insight Instruments, Ribeirao Preto, Brazil) with the front made of Plexiglas and the floor made of parallel 5 mm caliber stainless-steel bars spaced 15 mm apart. The box was divided into 2 compartments of the same size by a wall, with a door that remained open during the tests. The animals were trained in 3 sessions, one on each of 3 consecutive days. In each session, after 10 min (Day 1) or 5 min (Days 2 and 3) of habituation, 50 sound cues (CS: 1.5 kHz, 60 dB, maximum duration of 10 s) were paired with a subsequent 0.5 mA footshock (US: maximum duration of 5 s, starting 5 s after the CS onset) until the rat crossed to the other compartment. Four measures of behaviour were taken: (i) avoidance: during presentation of the CS, the rat could turn off the sound and actively avoid the shock by crossing to the other chamber; (ii) escape: after the CS, when the US footshock was presented, the rat could escape by crossing to the other chamber; (iii) non-response: the trials in which the rat did not cross to the other chamber during either the CS or US presentation were counted as a non-response; (iv) inter-trial crossing (ITC): the time between each trial varied randomly, ranging from 10–50 s. During this, rats could spontaneously cross from one side of the apparatus to the other; the number of crossings was recorded as the ITC. The number of active avoidances, escapes, non-responses, and ITC crossings were recorded automatically by the apparatus and captured on computer.

Behavioural analysis of the lesion

Two days after the 2-way active avoidance sessions, the rats received 1 mg/kg apomorphine (Sigma-Aldrich, s.c.) and the number of 360° turns toward the lesioned side (ipsiversive) and toward the opposite side (contraversive) was scored over a period of 1 h in a Rota-Count apparatus (Columbus Instruments, Columbus, Ohio, USA). The SNc unilateral rats that made less than 80 ipsiversive turns / h were excluded from the analysis. This test was performed as a behavioural control for the lesion because it is known that MPTP rats bearing incomplete unilateral lesions of nigral cell loss present ipsiversive turning behaviour (Da Cunha, Wietzikoski, Ferro, Martinez, Vital, Hipolide, Tufik, and Canteras, 2008). The PPTg unilateral rats that made less than 80 contraversive turns / h were excluded from the analysis. Contraversive turning was expected from PPTg unilateral rats, as previously reported after inhibition of rat PPTg with GABA(A) agonists (Ikeda, Akiyama, Matsuzaki, Sato, Moribe, Koshikawa, and Cools, 2004) or blockade of muscarinic receptors in the SNc usually occupied by acetylcholine (ACh) released by PPTg neurons (Góngora-Alfaro, Hernandez-Lopez, Martinez-Fong, Flores, and Aceves, 1996).

Histological and neurochemical analysis of the lesions

Histological analysis was carried out on all rats in this study after behavioural procedures were complete. After a terminal anaesthetic dose of pentobarbitone, the brains were fixed *in situ* using transcardial perfusion at room temperature of heparinized 0.9% saline followed by 4% paraformaldehyde in phosphate buffer, pH 7.4. The brains were removed and post-fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer, pH 7.4. for 72 h at 4°C. The brains were then stored in 20% sucrose in 4% paraformaldehyde in

phosphate buffer (pH 7.4) until they were cut. Eight series of sections 50 μ thick 200 μ apart were cut on a freezing microtome through the regions of interest. The sections were stored in cryoprotectant at -20°C until immunohistochemistry was carried out.

PPTg lesions and shams: Two series of sections 100 μ apart were processed free floating to demonstrate choline acetyltransferase (ChAT) and neuronal nuclear protein (NeuN) using immunohistochemical techniques. Primary antibodies were goat anti ChAT polyclonal antibody and mouse anti NeuN both from (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA), followed by appropriate Vector Elite Peroxidase ABC kits (Vector Labs, Peterborough, UK) and Sigma fast DAB substrate (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). After the NeuN stained sections were mounted, a light counterstain of cresyl fast violet was applied to allow non-neuronal structures (such as myelin, blood vessels and glial cells) to be identified using a light microscope to estimate the damage to PPTg. Remaining ChAT positive neurons were counted by an observer blind with respect to rats' treatment group and the extent of the lesion was estimated by absence of neuronal structures and the presence of reactive gliosis and calcification seen in the NeuN / cresyl fast violet stain and scored on a linear scale of 0% (no lesion) to 100% (complete lesion).

SNC lesions and shams: One series of sections 200 μ apart were processed, free floating to demonstrate tyrosine hydroxylase (TH) using immunohistochemical techniques. Primary antibody was mouse anti-TH polyclonal antibody (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA) followed by appropriate Vector Elite Peroxidase ABC kits (Vector Labs, Peterborough, UK) and Sigma fast DAB (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Using a light microscope, the extent of damage to midbrain DA neurons was estimated by an observer blind with respect to rats' treatment group on a

linear scale of 0% (no lesion) to 100% (complete lesion) from the remaining TH positive neurons in the SNc and VTA.

Neurochemical analysis of the effects of lesions was performed in rats that were not submitted to the behavioural tests. Twenty one days after surgery, rats were killed by rapid decapitation and their dorsal striata were dissected on ice and stored at -70° C. Endogenous levels of DA were assayed by reverse-phase HPLC with electrochemical detection (ED). The system consisted of a Synergi Fusion-RP C-18 reverse-phase column (150 x 4.6 mm i.d., 4- μ m particle size, Phenomenex, Torrance, CA, USA), an dual coulometric electrochemical detector (Coulochem III, ESA, Chelmsford, USA), and an LC-20AT pump (Shimadzu, Kyoto, Japan). This detector consists of 2 cells successively connected, both containing a porous graphite working electrode together with associated reference and counter electrodes. The detector is equipped with a guard cell (ESA 5020) electrode set at +350 mV and the working electrodes (5011 analytical cell, ESA) set at E1=+100 and E2=+450 mV versus a solid state palladium reference electrode. The column was maintained inside a temperature-controlled oven (25°C). The tissue samples were homogenized with an ultrasonic cell disrupter (Sonics, Newtown, CT, USA) in 0.1 M perchloric acid. After centrifugation at 15,000 g for 30 min, 20 μ l of the supernatant was injected into the chromatograph. The mobile phase, used at a flow rate of 1 ml/min, had the following composition: 15.7 g citric acid, 471.5 ml HPLC-grade water, 78 mg heptane sulfonic acid, 20 ml acetonitrile, and 10 ml tetrahydrofuran, pH 3.0. The peak areas of the external standards were used to quantify the sample peaks.

Data analysis

After examination of turning behaviour and histological analysis of the lesions, the numbers of rats included in the analysis of active avoidance were: PPTg unilateral, $n = 6$; SNc unilateral, $n = 8$; PPTg-SNc ipsilateral, $n = 5$; PPTg-SNc contralateral, $n = 4$. Data from sham rats of all types were pooled because no significant difference was found among the groups; $n = 12$. Another 9 sham, 9 PPTg unilateral, and 11 SNc unilateral, rats were used in the neurochemical analysis.

The 2-way active avoidance data (number of avoidances, escapes, ITC, and non-responses) were analyzed by two-way ANOVA, taking the trials blocks or training days as repeated measures. The avoidance data was also analyzed by three-way ANOVA, taking the number of non-response as covariate. Differences among groups were analyzed by the *post hoc* Newman-Keuls test. Correlations between two variables were analyzed by the Pearson test. Differences were considered to be statistically significant when $p < 0.05$.

Results

Fig. 1 illustrates typical PPTg lesions. These extended into most parts of the PPTg with almost total destruction of Ch5 neurons (identified by ChAT immunostaining). Table 1 shows the loss of NeuN-immunostained neurons in the PPTg, which was of nearly 60-80% and significantly different from the sham group ($F(3,20) = 24.52$, $p < 0.001$ one-way ANOVA; $p < 0.01$, Newman-Keuls post hoc analysis). No significant difference was found among the PPTg unilateral, PPTg-SNc ipsilateral and PPTg-SNc

contralateral groups ($p > 0.1$, Newman Keuls test). Table 1 also shows that, compared to the sham group, the SNc-lesioned rats presented a significant loss of nearly 50% of the TH-immunoreactive neurons, ($F(3,19) = 3.99$, $p < 0.05$, one-way ANOVA; $p < 0.01$, Newman-Keuls post hoc analysis). No significant difference was found among the SNc unilateral, PPTg-SNc ipsilateral and PPTg-SNc contralateral groups ($p > 0.4$, Newman Keuls test). This lesion was mostly restricted to the A9 neurons of the SNc, sparing most of the A10 neurons of the VTA (Fig. 2). The SNc-lesioned rats presented a gradient of loss of the TH-immunostained terminals, damage being more intense in the most caudal portions of the striatum. In the rostral striatum, TH loss was more apparent in the dorsolateral part, with the dorsomedial striatum and the nucleus accumbens partly spared (Fig. 3). Based on the histology, data of the following animals were excluded from the analysis: 10 rats with small lesions (1 PPTg unilateral; 3 SNc unilateral; 2 PPTg-SNc ipsilateral, and 4 PPTg-SNc contralateral) and 2 with that lost more than 80% of the neurons in the SNc (1 SNc unilateral e 1 PPTg-SNc ipsilateral).

The effect of unilateral lesions of the PPTg or SNc on striatal DA is shown in Fig. 4. Two-way ANOVA showed significant effects of treatment ($F(2,51) = 4.87$, $p < 0.05$) and side ($F(1,51) = 5.47$, $p < 0.05$) and a significant interaction ($F(2,51) = 9.40$, $p < 0.001$). MPTP lesion of SNc caused a significant loss of nearly 60% of striatal DA on the lesioned side ($p < 0.05$, Newman-Keuls test) while PPTg excitotoxic lesions did not produce a significant reduction in striatal DA content (Fig. 4). These data clearly demonstrate different physical consequences of the SNc and PPTg lesions.

Two days after the 2-way active avoidance sessions, when challenged with 1 mg / kg s.c. apomorphine, PPTg unilateral rats made contraversive, and SNc unilateral rats ipsiversive turns (Fig. 5A). All PPTg unilateral rats included in the study made more than 80 contraversive turns / h and the SNc unilateral rats, more than 80 ipsiversive

turns / h. The turning scores of both groups were significantly higher than the scores of the sham rats: PPTg unilateral, $F(2,23) = 35.57$; $p < 0.001$; $p < 0.01$ Newman Keuls test; SNc unilateral, $F(2,23) = 36.85$, $p < 0.001$; $p < 0.01$ Newman Keuls test. One PPTg unilateral and two SNc unilateral rats were excluded because of failure to meet this criterion.

The turning scores of rats with combined lesions in PPTg and SNc were analyzed separately, because it was not possible to classify their turning behaviour as ipsiversive or contraversive in relation to the SNc and the PPTg at the same time. As can be seen in Fig. 5B, PPTg-SNc contralateral ($F(2,18) = 8.62$ $p < 0.05$; $p < 0.05$ Newman Keuls), but not the PPTg-SNc ipsilateral ($p = 0.22$, Newman Keuls), made significantly more turns towards the SNc lesioned side, compared to the sham lesioned rats. No significant difference in the number of contraversive turns was observed among the groups ($F(2,18) = 1.13$), $p = 0.34$). The PPTg-SNc combined lesioned rats showed ipsiversive rotation (as did the SNc unilaterally lesioned rats) but the presence of an ipsilateral PPTg lesion significantly attenuated ipsiversive rotation expected of rats with unilateral SNc lesions.

Three weeks after surgery, at the time of the 2-way active avoidance training, lesioned rats did not present turning behaviour or any other gross motor impairment when not drugged. They were not hypokinetic, aphagic or adipsic, and did not significantly differ from sham lesioned rats in relation to the reaction time in response to footshock ($F(4,30) = 1.56$, $P = 0.20$) or to the sound cue that signaled footstock ($F(4,28) = 0.32$, $p = 0.85$), as shown in Table 2. Reaction times to the footshock and sound cue were measured in the first trials, before they could be affected by learning.

As can be seen in Fig. 6, different to the other groups, the PPTg-SNc ipsilateral rats, did not improve their latencies to respond to the CS (sound cue) across training days. In

addition to this, the PPTg-SNc contralateral rats showed no sign of learning, even in the responding to the footshock (US). A two-way ANOVA of the mean latencies during the 3 days of training showed significant effects of treatment ($F(4,30) = 7.00, p < 0.001$), day of training ($F(2,60) = 37.52, p < 0.001$) and an interaction ($F(8,60) = 0.97, p = 0.46$). Post-hoc analysis is detailed in Fig. 6. Fig. S1 shows how the different groups improved their latency to respond to the US and CS in the first day of training.

Similar conclusions were taken from analysis of the number of responses during the 2-way active avoidance training (Fig. 7 and Fig. S2). As can be seen in Table 3, 2-way ANOVA of the data averaged by day showed significant treatment effects on avoidance (PPTg-SNc ipsilateral and contralateral) and non-response scores (PPTg-SNc contralateral). These analyses also showed a significant session (training day) effects on avoidance, escape, and non-response scores but not a significant interaction between these 2 factors on all scores.

Post-hoc analysis of the number of avoidances showed same pattern of improvement observed for the latencies to respond to the CS or US: the PPTg-SNc contralateral group was significantly worse than all the other groups and was the only one that did not improve this score. Although the PPTg-SNc ipsilateral rats improved their avoidances scores, they scored significantly worse than the sham rats. On the other hand, the PPTg and SNc unilateral rats were not significantly different of the sham rats (Fig. 7A). Analysis of the number of escapes also supports this conclusion because only the sham and PPTg unilateral rats significantly improved across training days (Fig. 7B). The ITC scores did not significantly differ among the groups (Fig. 7C) and the PPTg-SNc contralateral group was the only one to present a significantly higher number of non-responses (Fig. 7D). This might suggest that instead of a learning deficit, they were impaired in responding to the CS and US. However, correlation between the scores of

avoidance and non-response for this group was weak (Table S1; see also Tables S2 and S3 for the correlations between the other variables). In addition, a three-way ANOVA of avoidance scores, taking the number of non-responses in the first day as a covariate showed that, independent of presenting a higher number of non-responses, the PPTg-SNc contralateral rats were impaired to learn this avoidance task (lesion factor: $F(4,29) = 3.50, p < 0.05$; session day factor: $F(2,60) = 28.27, p < 0.001$; interaction: $F(8,60) = 1.79, p = 0.01$; $p < 0.01$ Newman-Keuls *pos hoc* test).

Discussion

We have shown that combined unilateral lesions of the PPTg and SNc in opposite hemispheres impeded learning of the 2-way active avoidance task, but ipsilateral lesions in these two structures caused only a mild impairment, and unilateral lesion in just one of them caused no impairment at all. This strongly suggests that the interaction between these structures is necessary for CAR learning. This is not to argue that both PPTg and SNc have the same functional properties: striatal DA is depleted by the SNc lesions but not PPTg; and the rotational response to apomorphine differs after PPTg and SNc unilateral lesions. What the data do indicate though is that the two structures are operating within the same functional domain, and that combined contralateral lesions cause a profound impairment of learning without affecting reaction time measures of motor performance. This impairment of the PPTg-SNc contralateral lesioned rats shows that ipsilateral connections between the PPTg and SNc are critical for learning and that a contralateral connection is not sufficient to support learning.

These results are in agreement with previous studies showing interconnections between the PPTg and SNc (Beninato and Spencer, 1987; Clarke et al., 1987; Gould et al., 1989; Woolf and Butcher, 1986) are predominantly ipsilateral (Beninato and Spencer, 1987; Clarke et al., 1987; Gould et al., 1989; Mena-Segovia et al., 2008 for review). Other studies showed that the PPTg can modulate SNc activity by the release of ACh and glutamate (Di Giovanni and Shi, 2009; Futami, Takakusaki, and Kitai, 1995; Gould et al., 1989; Scarnati, Campana, and Pacitti, 1984; Scarnati, Proia, Campana, and Pacitti, 1986). Some authors hypothesize that, by this connection, the PPTg triggers the reward prediction error signal generated by midbrain DA neurons, a signal that is critical for learning of actions that result in a reward or avoid an aversive event (Kobayashi and Okada, 2007; Mena-Segovia et al., 2008; Pan and Hyland, 2005). There is also evidence of modulation of the PPTg by SNc neurons (Saavedra, Brownstein, Kizer, and Palkovits, 1976; Versteeg, Van Der Gugten, De Jong, and Palkovits, 1976). Support for a functional interaction between the PPTg and the SNc also comes from studies showing both hyperactivity (Carlson, Pearlstein, Buchholz, Iacono, and Maeda, 1999; Orioux, Francois, Feger, Yelnik, Vila, Ruberg, Agid, and Hirsch, 2000) and hypoactivity of PPTg neurons in animal models of Parkinson's disease (Aravamuthan, Bergstrom, French, Taylor, Parr-Brownlie, and Walters, 2008; Gomez-Gallego, Fernandez-Villalba, Fernandez-Barreiro, and Herrero, 2007).

An ipsilateral projection from the PPTg to the SNc seems to be important also to the initiation of the avoidance response because the PPTg-SNc contralateral group was the only one to present a higher number of non-responses to the CS and US. This suggests that, much as with Parkinson's disease patients (Grahn, Parkinson, and Owen, 2009a), they had difficulty in choosing and/or initiating proper actions. However, they were not impaired in performing all of the actions of their repertory: they were not impaired to

move through the shuttle box in the inter-trials intervals, nor did they present slower responses to the CS or to the US. They simply failed to initiate such responses in the proper time as frequently as the others. Such an effect probably resulted from a deficient DA tone to stimulate D1 receptors in the striatal neurons of the direct pathway, responsible for disinhibition a specific action that was previously reinforced (Alexander, DeLong, and Strick, 1986; Da Cunha et al., 2009). Such avoidance failure might have affected learning, because they had fewer occasions to be reinforced, but the correlation between the number of avoidances and non-responses was weak and barely significant for the PPTg-SNc contralateral group. Therefore, it seems that, in addition to impairment in initiating the proper response, they were also impaired to learn this CAR task, since their avoidance score was significantly lower (even discounting the impact of the non-responses on it). In other words, PPTg-SNc contralateral rats did not learn from their experience, even in the few occasions when they were reinforced for presenting the avoidance response and in the many occasions when they were punished for not presenting the avoidance response. This probably resulted from a failure in presenting a phasic DA response in these occasions, as discussed below.

In the present study we observed that rats bearing unilateral lesions in the PPTg or SNc could learn the 2-way active avoidance task as well as the controls. This does not mean that learning deficits can be caused only by a lesion in both structures. The rats used in the present study had only partial and unilateral lesions in the PPTg or SNc. Indeed, rats bearing almost total unilateral loss of SNc DA neurons presented a deficit to learn this task (data not shown), but they were excluded from this study because our purpose was not testing the effect of the lesion of the PPTg or SNc *per se*, but of the disconnection between them.

There is compelling evidence that the PPTg is important for procedural learning. This includes the studies showing that bilateral electrolytic (Satorra-Marin, Coll-Andreau, Portell-Cortes, Aldavert-Vera, and Morgado-Bernal, 2001) or excitotoxic lesions of the PPTg (Fujimoto, Ikeguchi, and Yoshida, 1992; Fujimoto, Yoshida, Ikeguchi, and Nijima, 1989; Kessler, Markowitsch, and Sigg, 1986) impair the ability of rats to learn active and inhibitory avoidance tasks, and that interference with the PPTg affects the ability to learn bar pressing or maze tasks motivated by either natural and drug rewards (Alderson, Brown, Latimer, Brasted, Robertson, and Winn, 2002; Alderson, Latimer, Blaha, Phillips, and Winn, 2004; Alderson and Winn, 2005; Corrigall, Coen, Zhang, and Adamson, 2001; Corrigall, Coen, Zhang, and Adamson, 2002; Inglis, Dunbar, and Winn, 1994; Inglis, Olmstead, and Robbins, 2000; Keating and Winn, 2002; Olmstead and Franklin, 1994; Olmstead, Robbins, and Everitt, 1998; Taylor, Kozak, Latimer, and Winn, 2004). Likewise, there is extensive evidence that the SNc is critical for procedural learning. Rats bearing partial bilateral lesions of the SNc were impaired in learning 2-way active avoidance (Da Cunha, Gevaerd, Vital, Miyoshi, Andreatini, Silveira, Takahashi, and Canteras, 2001; Gevaerd, Miyoshi, Silveira, Canteras, Takahashi, and Da Cunha, 2001; Gevaerd, Takahashi, Silveira, and Da Cunha, 2001), inhibitory avoidance (del Guante, Rivas, Prado-Alcala, and Quirarte, 2004), the cued version of the Morris water maze (Da Cunha, Wietzikoski, Wietzikoski, Miyoshi, Ferro, Anselmo-Franci, and Canteras, 2003; Da Cunha, Wietzikoski, Wietzikoski, Silva, Chandler, Ferro, Andreatini, and Canteras, 2007; Ferro, Bellissimo, Anselmo-Franci, Angellucci, Canteras, and Da Cunha, 2005; Miyoshi, Wietzikoski, Camplessei, Silveira, Takahashi, and Da Cunha, 2002) and bar pressing for appetitive reward (Faure, Haberland, Conde, and El Massioui, 2005). Learning deficits have also been observed in mouse and monkey models of Parkinson's disease, as well as in Parkinson's disease

patients (Fernandez-Ruiz, Wang, Aigner, and Mishkin, 2001; Grahn, Parkinson, and Owen, 2009b; Hood, Postle, and Corkin, 1999; Kimura, 1995; Knowlton, Squire, Paulsen, Swerdlow, Swenson, and Butters, 1996; Roncacci, Troisi, Carlesimo, Nocentini, and Caltagirone, 1996; Salmon and Butters, 1995). Such learning impairments are in agreement with the role suggested for the phasic release of DA in reinforcement learning (Da Cunha *et al.*, 2009). There is strong evidence that the phasic activity of midbrain DA neurons signals unpredicted rewarding (Schultz, 1998) or aversive stimuli (Horvitz, 2009; Matsumoto and Hikosaka, 2009). The activation of DA receptors reinforces corticostriatal synapses between neurons that are active at the same time (Hebbian long-term potentiation) and weakens synapses between non-active corticostriatal neurons (Hebbian long-term depression, see Calabresi, Picconi, Tozzi, and Di Filippo, 2007; Calabresi, Pisani, Mercuri, and Bernardi, 1992; Wickens, 2009). This mechanism increases the likelihood that a stimulus (CS) paired with reward (US) can trigger the action performed to get it (Da Cunha *et al.*, 2009). A similar mechanism may mediate avoidance learning: the likelihood of performing the action that halted an aversive US or halted the warning CS may increase with training because of phasic release of DA. A recent study reported that different populations of midbrain DA neurons fire in response to appetitive and aversive stimuli, respectively (Matsumoto and Hikosaka, 2009). The failure of the SNc-PPTg contralateral rats to learn this kind of conditional avoidance supports this explanation and suggests that the phasic response of midbrain DA neurons may be under the control of the PPTg, as proposed by Kobayashi & Okada (2007).

In conclusion, the findings of the present study give some clue about the architecture of PPTg-SNc connections and its functional relevance in the acquisition and expression of conditioned avoidance responses. The memory of how to avoid an

aversive event is a kind of procedural memory – the memory of how to choose the proper action that results in getting a reward or avoiding an aversive outcome. Such knowledge is critical for improving treatments of diseases in which the basal ganglia fail to learn and/or initiate proper actions. This includes neurological diseases such as Parkinson's and Huntington's and psychiatric diseases such as schizophrenia and attention-deficit hyperactivity disorder. The first interventions in Parkinson's disease patients with deep brain stimulation of the PPTg (Mazzone, Lozano, Stanzione, Galati, Scarnati, Peppe, and Stefani, 2005; Pierantozzi, Palmieri, Galati, Stanzione, Peppe, Tropepi, Brusa, Pisani, Moschella, Marciani, Mazzone, and Stefani, 2008; Stefani, Lozano, Peppe, Stanzione, Galati, Tropepi, Pierantozzi, Brusa, Scarnati, and Mazzone, 2007) stress the urgency of this knowledge in order to get the best from this kind of therapy and avoid possible cognitive side effects.

Acknowledgments

This study was supported by grants to CDC from the CNPq and CAPES, and by Wellcome Trust project grant 081128 t Z 06 b Z to PW which supports Duncan A.A. MacLaren. The authors thank Edmar Miyoshi, Silvia N. Cordazzo, and Lindacir do Rocio Nascimento for their technical assistance.

References

- Alderson, H. L., Brown, V. J., Latimer, M. P., Brasted, P. J., Robertson, A. H., & Winn, P. (2002). Excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus in rats: an examination of the perception of reward strength measured by responding on a progressive ratio schedule of reinforcement. *Neuroscience*, *112*, 417-425.
- Alderson, H. L., Latimer, M. P., Blaha, C. D., Phillips, A. G., & Winn, P. (2004). An examination of d-amphetamine self-administration in pedunculopontine tegmental nucleus-lesioned rats. *Neuroscience*, *125*, 349-358.
- Alderson, H. L., & Winn, P. (2005). *The pedunculopontine and reinforcement*. New York: Springer.
- Alexander, G. E., DeLong, M. R., & Strick, P. L. (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annual Review of Neuroscience*, *9*, 357-381.
- Aravamuthan, B. R., Bergstrom, D. A., French, R. A., Taylor, J. J., Parr-Brownlie, L. C., & Walters, J. R. (2008). Altered neuronal activity relationships between the pedunculopontine nucleus and motor cortex in a rodent model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, *213*, 268-280.
- Balleine, B. W., Liljeholm, M., & Ostlund, S. B. (2009). The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behavioural Brain Research* *199*, 43-52.
- Beninato, M., & Spencer, R. F. (1987). A cholinergic projection to the rat substantia-nigra from the pedunculopontine tegmental nucleus. *Brain Research*, *412*, 169-174.

- Beninato, M., & Spencer, R. F. (1988). The Cholinergic Innervation of the Rat Substantia Nigra - a Light and Electron-Microscopic Immunohistochemical Study. *Experimental Brain Research*, 72, 178-184.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., & Di Filippo, M. (2007). Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 30, 211-219.
- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N. B., & Bernardi, G. (1992). Long-term Potentiation in the Striatum is Unmasked by Removing the Voltage-dependent Magnesium Block of NMDA Receptor Channels. *European Journal of Neuroscience*, 4, 929-935.
- Carbon, M., & Marie, R. M. (2003). Functional imaging of cognition in Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology*, 16, 475-480.
- Carlson, J. D., Pearlstein, R. D., Buchholz, J., Iacono, R. P., & Maeda, G. (1999). Regional metabolic changes in the pedunculopontine nucleus of unilateral 6-hydroxydopamine Parkinson's model rats. *Brain Research*, 828, 12-19.
- Clarke, P. B. S., Hommer, D. W., Pert, A., & Skirboll, L. R. (1987). Innervation of substantia nigra neurons by cholinergic afferents from pedunculopontine nucleus in the rat - neuroanatomical and electrophysiological evidence. *Neuroscience*, 23, 1011-1019.
- Cohen, M. X., & Frank, M. J. (2009). Neurocomputational models of basal ganglia function in learning, memory and choice. *Behavioural Brain Research*, 199, 141-156.
- Corrigall, W. A., Coen, K. M., Zhang, J., & Adamson, K. L. (2001). GABA mechanisms in the pedunculopontine tegmental nucleus influence particular

aspects of nicotine self-administration selectively in the rat.

Psychopharmacology, 158, 189-197.

Corrigall, W. A., Coen, K. M., Zhang, J., & Adamson, K. L. (2002). Pharmacological manipulations of the pedunculopontine tegmental nucleus in the rat reduce self-administration of both nicotine and cocaine. *Psychopharmacology*, 160, 198-205.

Da Cunha, C., Gevaerd, M. S., Vital, M., Miyoshi, E., Andreatini, R., Silveira, R., Takahashi, R. N., & Canteras, N. S. (2001). Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behavioural Brain Research*, 124, 9-18.

Da Cunha, C., Wietzikoski, E. C., Dombrowski, P., Santos, L. M., Bortolanza, M., Boschen, S. L., & Miyoshi, E. (2009). Learning processing in the basal ganglia: A mosaic of broken mirrors. *Behavioural Brain Research*, 199, 156-169.

Da Cunha, C., Wietzikoski, E. C., Ferro, M. M., Martinez, G. R., Vital, M., Hipolide, D., Tufik, S., & Canteras, N. S. (2008). Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. *Behavioural Brain Research*, 189, 364-372.

Da Cunha, C., Wietzikoski, S., Wietzikoski, E. C., Miyoshi, E., Ferro, M. M., Anselmo-Franci, J. A., & Canteras, N. S. (2003). Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. *Neurobiology of Learning and Memory*, 79, 236-242.

Da Cunha, C., Wietzikoski, S., Wietzikoski, E. C., Silva, M. H. C., Chandler, J., Ferro, M. M., Andreatini, R., & Canteras, N. S. (2007). Pre-training to find a hidden platform in the Morris water maze can compensate for a deficit to find a cued

- platform in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87, 451-463.
- Del Guante, M. A. D., Rivas, M., Prado-Alcala, R. A., & Quirarte, G. L. (2004). Amnesia produced by pre-training infusion of serotonin into the substantia nigra. *Neuroreport*, 15, 2527-2529.
- Di Giovanni, G., & Shi, W. X. (2009). Effects of Scopolamine on Dopamine Neurons in the Substantia Nigra: Role of the Pedunculopontine Tegmental Nucleus. *Synapse*, 63, 673-680.
- Dubois, B., & Pillon, B. (1997). Cognitive deficits in Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, 244, 2-8.
- Faure, A., Haberland, U., Conde, F., & El Massioui, N. (2005). Lesion to the nigrostriatal dopamine system disrupts stimulus-response habit formation. *Journal of Neuroscience*, 25, 2771-2780.
- Fernandez-Ruiz, J., Wang, J., Aigner, T. G., & Mishkin, M. (2001). Visual habit formation in monkeys with neurotoxic lesions of the ventrocaudal neostriatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 4196-4201.
- Ferro, M. M., Bellissimo, M. I., Anselmo-Franci, J. A., Angellucci, M. E. M., Canteras, N. S., & Da Cunha, C. (2005). Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. *Journal of Neuroscience Methods*, 148, 78-87.
- Fujimoto, K., Ikeguchi, K., & Yoshida, M. (1992). Impaired Acquisition, Preserved Retention and Retrieval of Avoidance-Behavior after Destruction of Pedunculopontine Nucleus Areas in the Rat. *Neuroscience Research*, 13, 43-51.

- Fujimoto, K., Yoshida, M., Ikeguchi, K., & Nijima, K. (1989). Impairment of Active-Avoidance Produced after Destruction of Pedunculopontine Nucleus Areas in the Rat. *Neuroscience Research*, 6, 321-328.
- Futami, T., Takakusaki, K., & Kitai, S. T. (1995). Glutamatergic and Cholinergic Inputs from the Pedunculopontine Tegmental Nucleus to Dopamine Neurons in the Substantia-Nigra Pars Compacta. *Neuroscience Research*, 21, 331-342.
- Gevaerd, M. S., Miyoshi, E., Silveira, R., Canteras, N. S., Takahashi, R. N., & Da Cunha, C. (2001). L-dopa restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 4, 361-370.
- Gevaerd, M. S., Takahashi, R. N., Silveira, R., & Da Cunha, C. (2001). Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. *Brain Research Bulletin*, 55, 101-106.
- Gomez-Gallego, M., Fernandez-Villalba, E., Fernandez-Barreiro, A., & Herrero, M. T. (2007). Changes in the neuronal activity in the pedunculopontine nucleus in chronic MPTP-treated primates: an in situ hybridization study of cytochrome oxidase subunit I, choline acetyl transferase and substance P mRNA expression. *Journal of Neural Transmission*, 114, 319-326.
- Góngora-Alfaro, J. L., Hernandez-Lopez, S., Martinez-Fong, D., Flores, G., & Aceves, J. (1996). Circling behavior elicited by cholinergic transmission in the substantia nigra pars compacta: Involvement of nicotinic and muscarinic receptors. *Neuroscience*, 71, 729-734.
- Gould, E., Woolf, N. J., & Butcher, L. L. (1989). Cholinergic Projections to the Substantia Nigra from the Pedunculopontine and Laterodorsal Tegmental Nuclei. *Neuroscience*, 28, 611-623.

- Grahn, J. A., Parkinson, J. A., & Owen, A. M. (2009a). The role of the basal ganglia in learning and memory: neuropsychological studies. *Behav Brain Res*, 199, 53-60.
- Grahn, J. A., Parkinson, J. A., & Owen, A. M. (2009b). The role of the basal ganglia in learning and memory: neuropsychological studies. *Behavioural Brain Research*, 199, 53-60.
- Hood, K. L., Postle, B. R., & Corkin, S. (1999). An evaluation of the concurrent discrimination task as a measure of habit learning: performance of amnesic subjects. *Neuropsychologia*, 37, 1375-1386.
- Horvitz, J. C. (2009). Stimulus-response and response-outcome learning mechanisms in the striatum. *Behavioural Brain Research*, 199, 129-140.
- Ikeda, H., Akiyama, G., Matsuzaki, S., Sato, M., Moribe, S., Koshikawa, N. & Cools, A. R. (2004). Role of GABA(A) receptors in the pedunculopontine tegmental nucleus in rat turning behavior. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 7, S289-S289.
- Inglis, W. L., Dunbar, J. S., & Winn, P. (1994). Outflow from the nucleus accumbens to the pedunculopontine tegmental nucleus: a dissociation between locomotor activity and the acquisition of responding for conditioned reinforcement stimulated by amphetamine. *Neuroscience*, 62, 51-64.
- Inglis, W. L., Olmstead, M. C., & Robbins, T. W. (2000). Pedunculopontine tegmental nucleus lesions impair stimulus-reward learning in autoshaping and conditioned reinforcement paradigms. *Behavioral Neuroscience*, 114, 285-294.
- Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Da Silva, W. C., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: a review of recent findings. *Neurotoxicity Research*, 10, 113-121.

- Juri, C., & Chana, P. (2006). Levodopa for Parkinson's disease. What have we learned? *Revista Medica De Chile*, 134, 893-901.
- Keating, G. L., & Winn, P. (2002). Examination of the role of the pedunculopontine tegmental nucleus in radial maze tasks with or without a delay. *Neuroscience*, 112, 687-696.
- Kessler, J., Markowitsch, H. J., & Sigg, G. (1986). Memory related role of the posterior cholinergic system. *International Journal of Neuroscience*, 30, 101-119.
- Kimura, M. (1995). Role of basal ganglia in behavioral learning. *Neuroscience Research*, 22, 353-358.
- Knowlton, B. J., Squire, L. R., Paulsen, J. S., Swerdlow, N. R., Swenson, M., & Butters, N. (1996). Dissociations within nondeclarative memory in Huntington's disease. *Neuropsychology*, 10, 538-548.
- Kobayashi, Y., & Okada, K. C. (2007). Reward prediction error computation in the pedunculopontine tegmental nucleus neurons. *Reward and Decision Making in Corticobasal Ganglia Networks*, 1104, 310-323.
- Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2009). Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature*, 459, 838-842.
- Mazzone, P., Lozano, A., Stanzione, P., Galati, S., Scarnati, E., Peppe, A., & Stefani, A. (2005). Implantation of human pedunculopontine nucleus: a safe and clinically relevant target in Parkinson's disease. *Neuroreport*, 16, 1877-1881.
- Mena-Segovia, P., Winn, P., & Bolam, J. P. (2008). Cholinergic modulation of midbrain dopaminergic systems. *Brain Research Reviews*, 58, 265-271.
- Miyoshi, E., Wietzikoski, S., Camplessei, M., Silveira, R., Takahashi, R. N., & Da Cunha, C. (2002). Impaired learning in a spatial working memory version and in

- a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. *Brain Research Bulletin*, 58, 41-47.
- Okada, K., Toyama, K., Inoue, Y., Isa, T., & Kobayashi, Y. (2009). Different Pedunculopontine Tegmental Neurons Signal Predicted and Actual Task Rewards. *Journal of Neuroscience*, 29, 4858-4870.
- Olmstead, M. C., & Franklin, K., B.J. (1994). Lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus block drug-induced reinforcement but not amphetamine-induced locomotion. *Brain Research*, 638, 29-35.
- Olmstead, M. C., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (1998). Basal forebrain cholinergic lesions enhance conditioned approach responses to stimuli predictive of food. *Behavioral Neuroscience*, 112, 611-629.
- Orieux, G., Francois, C., Feger, J., Yelnik, J., Vila, M., Ruberg, M., Agid, Y., & Hirsch, E. C. (2000). Metabolic activity of excitatory parafascicular and pedunculopontine inputs to the subthalamic nucleus in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 97, 79-88.
- Packard, M. G., & McGaugh, J. L. (1992). Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behavioural Neuroscience*, 106, 439-446.
- Packard, M. G., & McGaugh, J. L. (1996). Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65, 65-72.
- Pan, W. X., & Hyland, B. I. (2005). Pedunculopontine tegmental nucleus controls conditioned responses of midbrain dopamine neurons in behaving rats. *Journal of Neuroscience*, 25, 4725-4732.

- Parkinson, J. A., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2000). Dissociable roles of the central and basolateral amygdala in appetitive emotional learning. *European Journal of Neuroscience*, 12, 405-413.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, CA, USA: Academic Press, Ltd.
- Pierantozzi, M., Palmieri, M. G., Galati, S., Stanzione, P., Peppe, A., Tropepi, D., Brusa, L., Pisani, A., Moschella, V., Marciani, M. G., Mazzone, P., & Stefani, A. (2008). Pedunculopontine nucleus deep brain stimulation changes spinal cord excitability in Parkinson's disease patients. *Journal of Neural Transmission*, 115, 731-735.
- Roncacci, S., Troisi, E., Carlesimo, G. A., Nocentini, U., & Caltagirone, C. (1996). Implicit memory in Parkinsonian patients: Evidence for deficient skill learning. *European Neurology*, 36, 154-159.
- Saavedra, J. M., Brownstein, M. J., Kizer, J. S., & Palkovits, M. (1976). Biogenic amines and related enzymes in the circumventricular organs of the rat. *Brain Research*, 107, 412-417.
- Salmon, D. P., & Butters, N. (1995). Neurobiology of skill and habit learning. *Current Opinion in Neurobiology*, 5, 184-190.
- Satorra-Marin, N., Coll-Andreau, M., Portell-Cortes, I., Aldavert-Vera, L., & Morgado-Bernal, I. (2001). Impairment of two-way active avoidance after pedunculopontine tegmental nucleus lesions: effects of conditioned stimulus duration. *Behavioural Brain Research*, 118, 1-9.
- Scarnati, E., Campana, E., & Pacitti, C. (1984). Pedunculopontine-Evoked Excitation of Substantia Nigra Neurons in the Rat. *Brain Research*, 304, 351-361.

- Scarnati, E., Proia, A., Campana, E., & Pacitti, C. (1986). A Microiontophoretic Study on the Nature of the Putative Synaptic Neurotransmitter Involved in the Pedunculopontine-Substantia Nigra Pars Compacta Excitatory Pathway of the Rat. *Experimental Brain Research*, 62, 470-478.
- Schultz, W. (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. (vol 80, pg 1, 1998). *Journal of Neurophysiology*, 80, U32-U32.
- Stefani, A., Lozano, A. M., Peppe, A., Stanzione, P., Galati, S., Tropepi, D., Pierantozzi, M., Brusa, L., Scarnati, E., & Mazzone, P. (2007). Bilateral deep brain stimulation of the pedunculopontine and subthalamic nuclei in severe Parkinson's disease. *Brain*, 130, 1596-1607.
- Taylor, C. L., Kozak, R., Latimer, M. P., & Winn, P. (2004). Effects of changing reward on performance of the delayed spatial win-shift radial maze task in pedunculopontine tegmental nucleus lesioned rats. *Behavioural Brain Research*, 153, 431-438.
- Versteeg, D. H., Van Der Gugten, J., De Jong, W., & Palkovits, M. (1976). Regional concentrations of noradrenaline and dopamine in rat brain. *Brain Research*, 113, 563-574.
- White, N. M. (2009). Some highlights of research on the effects of caudate nucleus lesions over the past 200 years. *Behavioural Brain Research*, 199, 3-23.
- Wickens, J. R. (2009). Synaptic plasticity in the basal ganglia. *Behavioural Brain Research*, 199, 119-128.
- Wolf, N. J., & Butcher, L. L. (1986). Cholinergic Systems in the Rat-Brain .3. Projections from the Pontomesencephalic Tegmentum to the Thalamus, Tectum, Basal Ganglia, and Basal Forebrain. *Brain Research Bulletin*, 16, 603-637.

Yin, H. H., & Knowlton, B. J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation.

Nature Reviews Neuroscience, 7, 464-476.

Zokoll, M. A., Klump, G. M., & Langemann, U. (2008). Auditory memory for temporal

characteristics of sound. *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology*

Sensory Neural and Behavioral Physiology, 194, 457-467.

Zuddas, A., Corsini, G. U., Schinelli, S., Johannessen, J. N., Diporzio, U., & Kopin, I. J.

(1989). MPTP treatment combined with ethanol or acetaldehyde selectively

destroys dopaminergic-neurons in mouse substantia nigra. *Brain Research*, 501,

1-10.

Figures

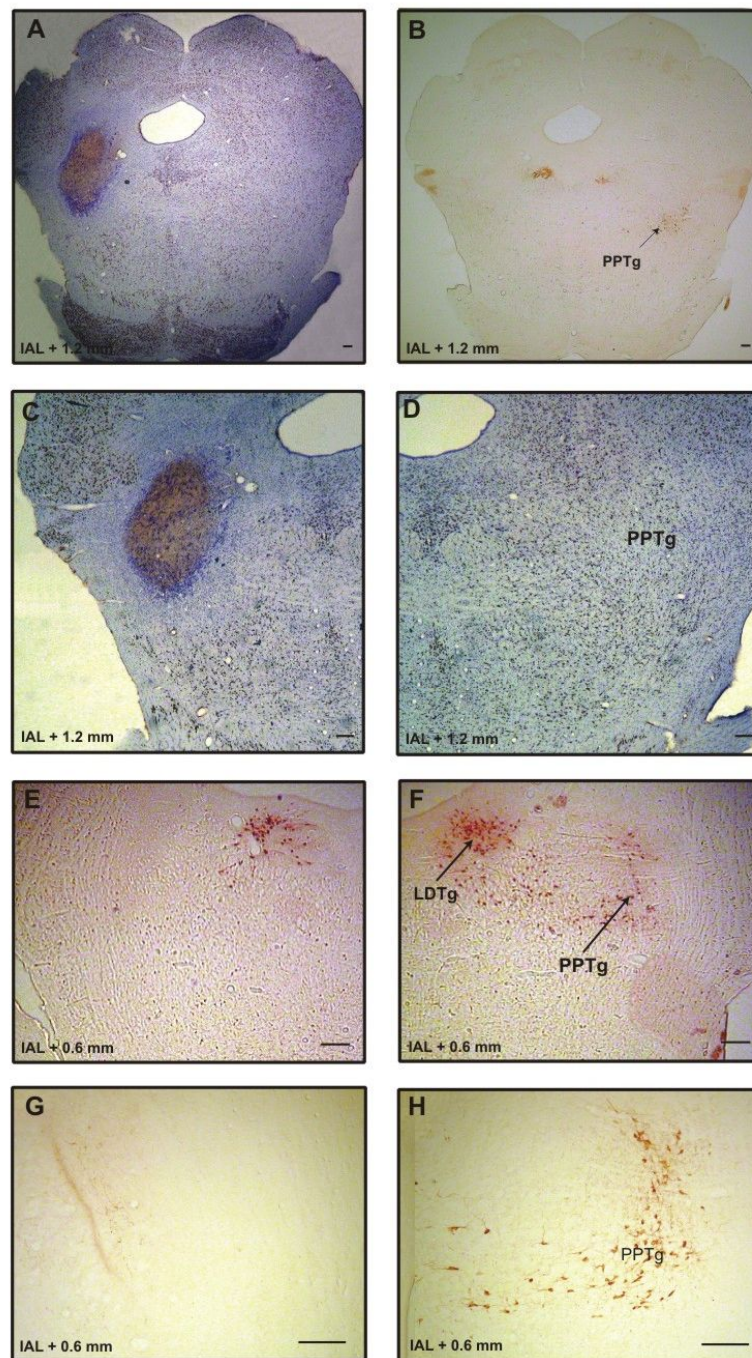


Fig. 1. Representative left side PPTg ibotenic acid lesion. Panels A, C, D show cresyl violet and NeuN immunostained tissue and panels B, E, F, G and H show ChAT immunostained tissue. The sham-lesioned tissue is shown in the panels D, F, and H, and the lesioned tissue is shown in the panels C, E, and G. IAL, Interaural line; LDTg, laterodorsal tegmental nucleus; PPTg, pedunculopontine tegmental nucleus; Scale bar represents 200 μ m

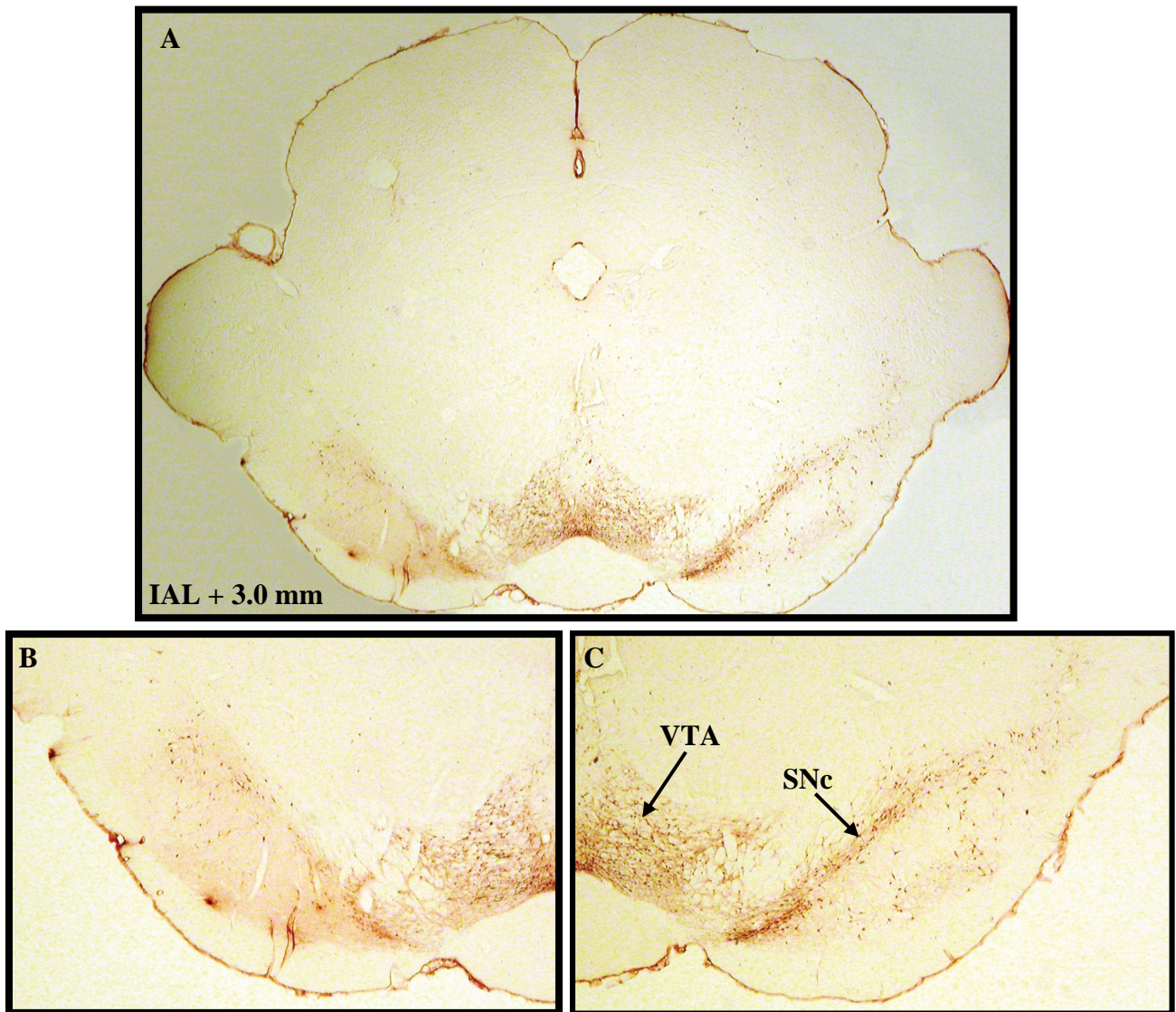


Fig. 2. Representative TH-immunostained left side SNc MPTP lesion. Panel A shows the lesion on the left side and sham on the right side. Panel B shows detail of the VTA and SNc of lesioned side, panel C the SNc and VTA of the sham side. SNc, substantia nigra compacta; VTA, ventral tegmental area. Scale bar represents 200 μ m

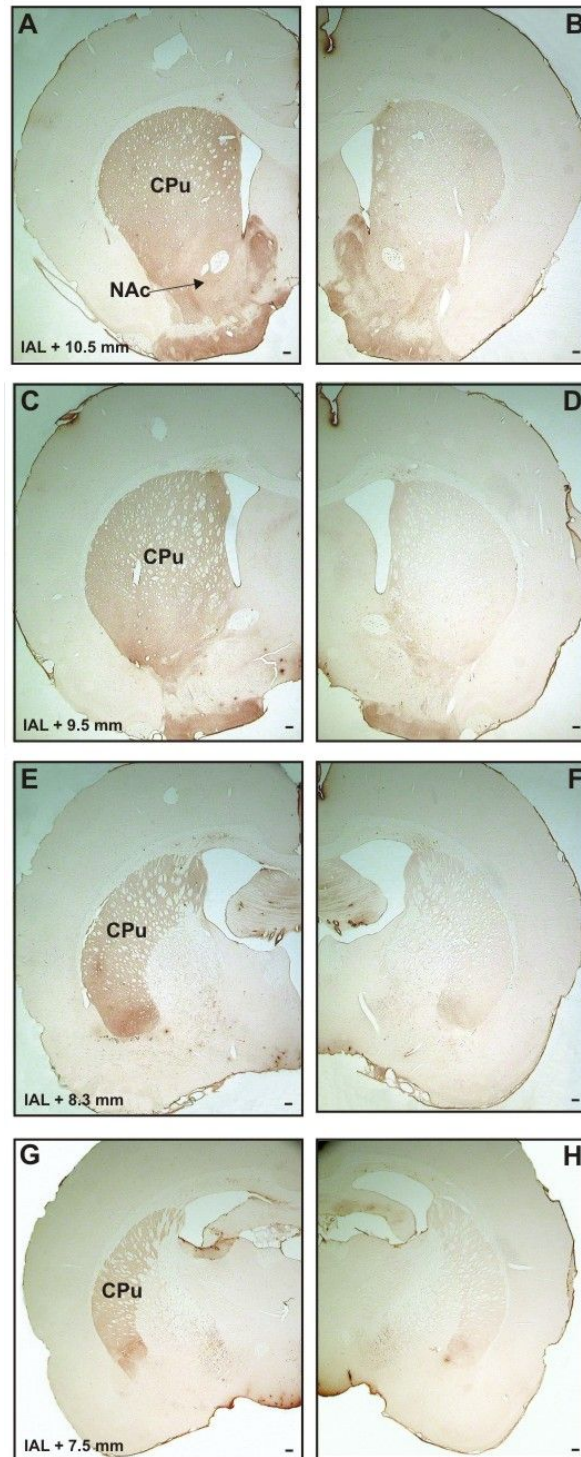


Fig. 3. Representative TH-immunostained coronal slices of the striatum (including the CPu and NAc) of a rat bearing an MPTP lesion of the right SNc. The slices are ordered in a rostral to caudal orientation. CPu, caudate-putamen; IAL, Interaural line; NAc, nucleus accumbens. Scale bar represents 200 μ m

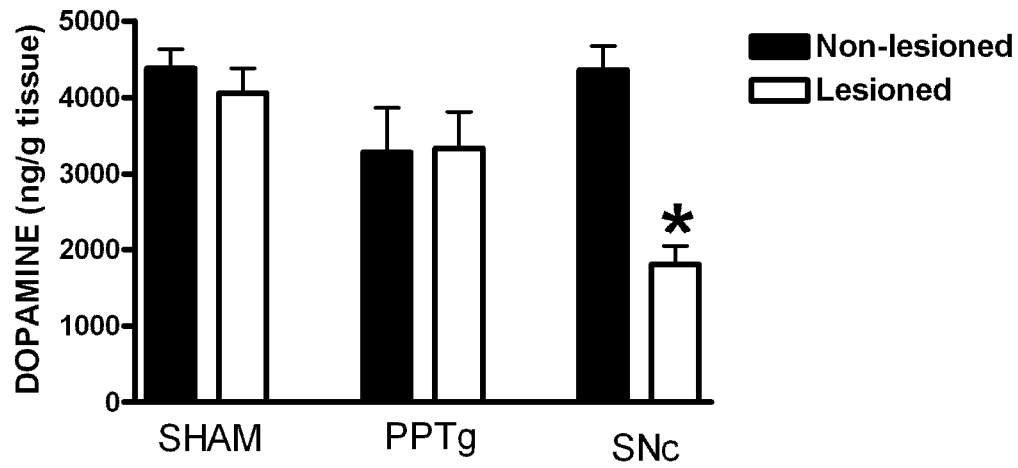


Fig. 4. Effects of unilateral infusion of 0.6 μmol MPTP into the rat SNc or of 24 nmol ibotenic acid into the PPTg on striatal dopamine content. * $P < 0.05$ Newman-Keuls after two-way ANOVA.

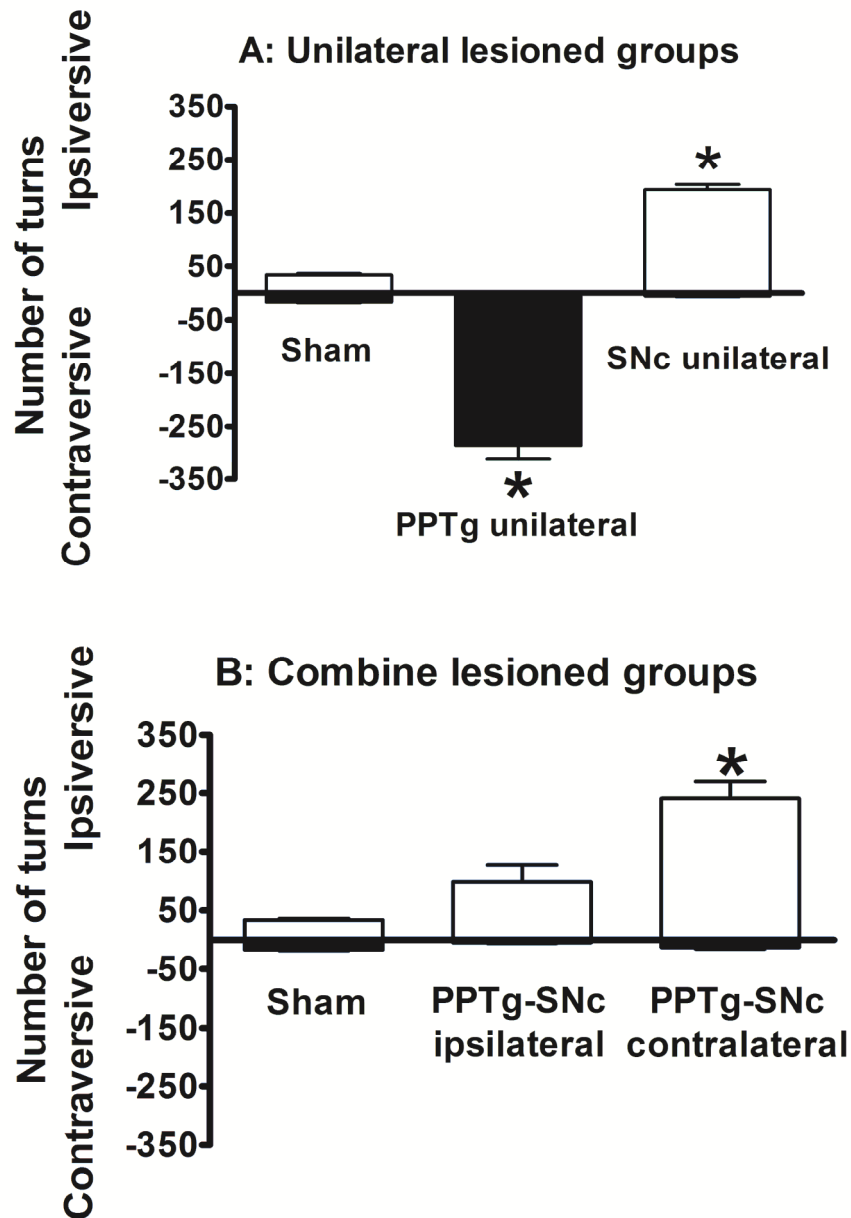


Fig. 5. Turning behaviour of unilaterally (A), ipsilaterally and contralaterally (B) PPTg and SNc lesioned rats challenged with 0.1 mg/kg apomorphine (i.p.). Data are expressed as the mean \pm SEM. number of ipsiversive (positive scale) and contraversive turns (negative scale) counted over 1 h after drug challenge ($n = 7 - 18$ animals per group). * $P \leq 0.05$ compared to the sham group (Newman-Keuls test after one-way ANOVA).

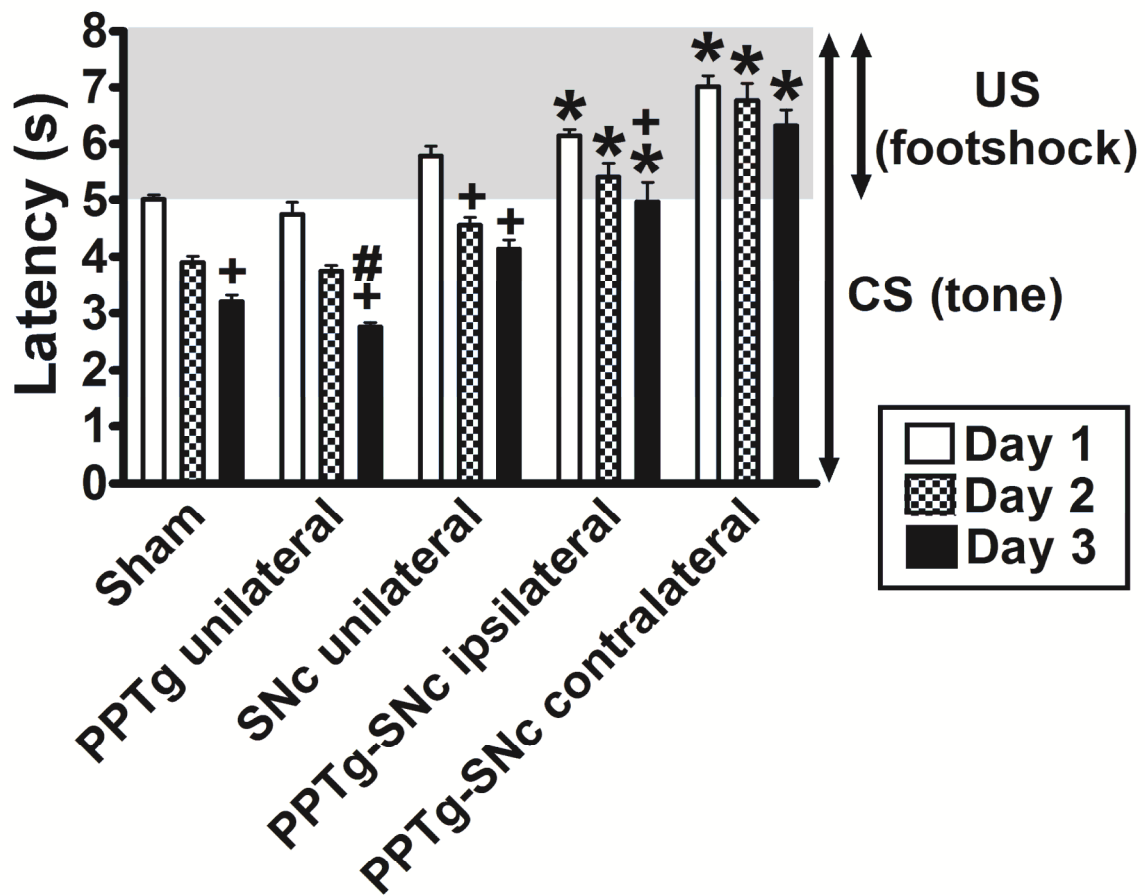


Fig. 6. Effect of the PPTg and/or SNc lesion on latency to respond to the CS and US during learning of a 2-way active avoidance response. Bars represent the mean \pm SEM latencies to cross to the opposite side of the shuttle box after the CS-US onset averaged by day. * $P < 0.05$ compared to sham rats in the same day; + $P < 0.05$ compared to the same group on day 1; # $P \leq 0.05$ compared to the same group on day 2; two-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls test.

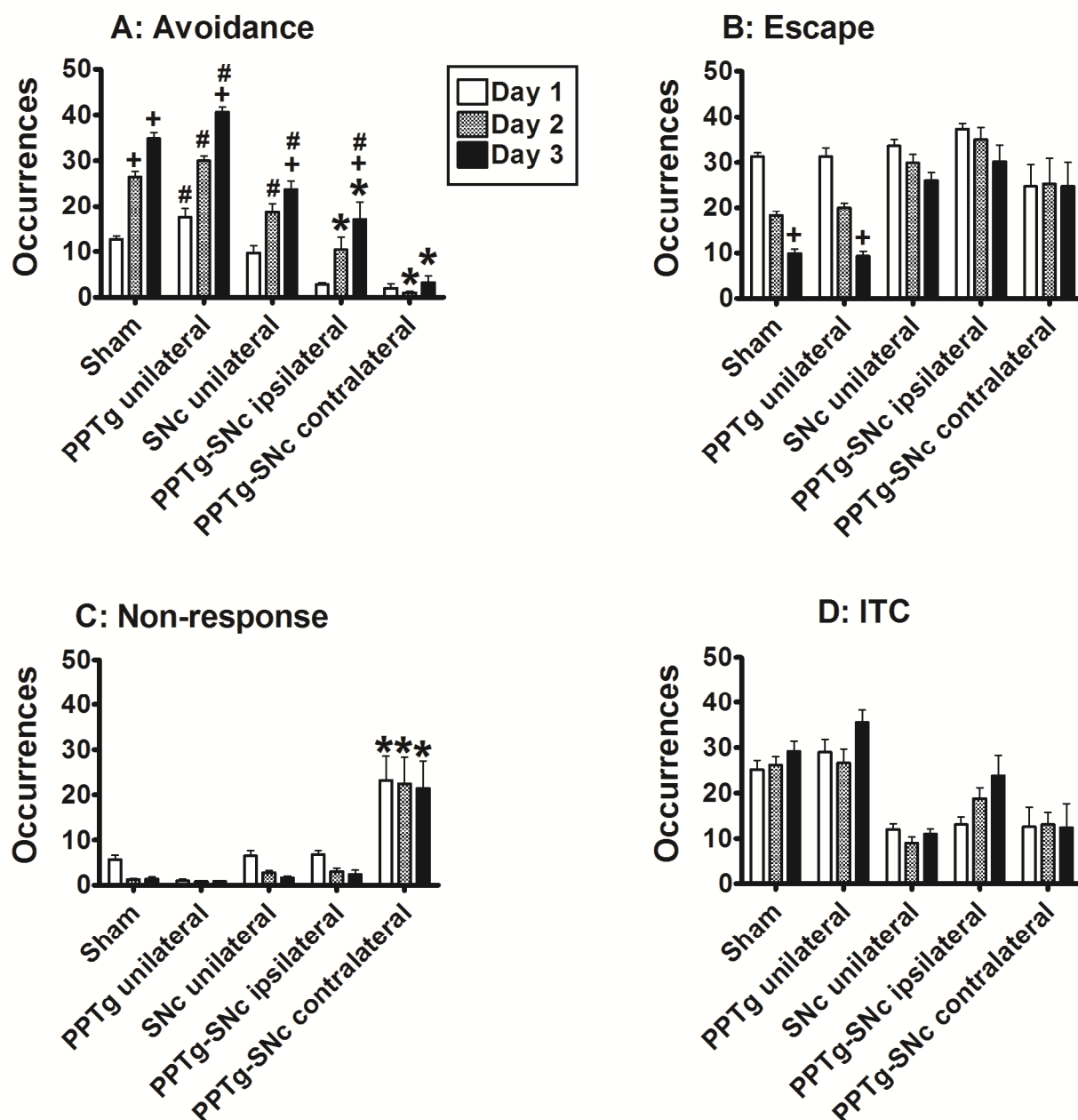


Fig. 7. Effect of the PPTg and/or SNc lesion on learning of the 2-way active avoidance.

The bars represent the mean \pm SEM number of avoidance (A), escape (B), non-response (C) or inter-trial crossings (ITC, D) averaged by day; * $P < 0.05$ compared to sham in the same day; + $P < 0.05$ compared to the same group on day 1 ; # $P \leq 0.05$ compared to the PPTg-SNc contralateral group in the same day; two-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls test.

Table 1

Evaluation of the extent of the lesions in the PPTg and SNc

| | % lesion | |
|------------------------|-------------|-------------|
| | PPTg | SNc |
| Sham | 0 ± 3 | 0 ± 20 |
| PPTg unilateral | 88 ± 6 (*) | - |
| SNc unilateral | - | 50 ± 10 (*) |
| PPTg-SNc ipsilateral | 63 ± 15 (*) | 45 ± 10 (*) |
| PPTg-SNc contralateral | 66 ± 14 (*) | 66 ± 9 (*) |

The effects of unilateral infusion of 24 nmoles ibotenic acid into the PPTg or 0.6 µmoles MPTP into the rat SNc on the extent of damage to the Neu-N positive neurons of the PPTg or to the TH-positive neurons of the SNc was estimated on a linear scale of 0% (no lesion) to 100% (complete lesion) expressed as the mean ± SEM. * $P < 0.05$ Newman-Keuls after two-way ANOVA.

Table 2

Effect of PPTg and/or SNc lesion on reaction time to the footshock and sound cue

| | Latency (s) | |
|------------------------|-------------|-----------|
| | Footshock | Sound cue |
| Sham | 1.4 ± 0.4 | 2.3 ± 0.3 |
| PPTg unilateral | 2.5 ± 0.6 | 2.7 ± 0.7 |
| SNc unilateral | 2.0 ± 0.4 | 2.9 ± 0.5 |
| PPTg-SNc ipsilateral | 1.7 ± 0.5 | 2.3 ± 0.7 |
| PPTg-SNc contralateral | 2.9 ± 0.7 | 3.0 ± 0.6 |

Data are expressed as the mean ± SEM. A one-way ANOVA showed no significant differences among the groups.

Table 3

ANOVA statistics of the active avoidance scores

| | Lesion | | Session | | Interaction | |
|--------------|-----------------|------|-----------------|-------|-----------------|------|
| | <i>F</i> (4,30) | P | <i>F</i> (2,60) | P | <i>F</i> (8,60) | P |
| Avoidance | 5.57 | 0.05 | 28.27 | 0.001 | 1.79 | 0.09 |
| Escape | 2.31 | 0.08 | 12.63 | 0.001 | 1.91 | 0.07 |
| ITC | 1.94 | 0.12 | 1.16 | 0.31 | 0.35 | 0.93 |
| Non-response | 5.51 | 0.05 | 5.50 | 0.05 | 0.25 | 0.97 |

Rats bearing unilateral and combined (ipsilateral or contralateral) lesions in the PPTg and/or the SNc. Because no significant difference was found between rats bearing left or right lesions in one of the structures, data were combined into a single group.

Avoidance, escape, ITC and non-response scores were analyzed by two-way ANOVA with repeated measures (training days).

Supplementary Data

Figure

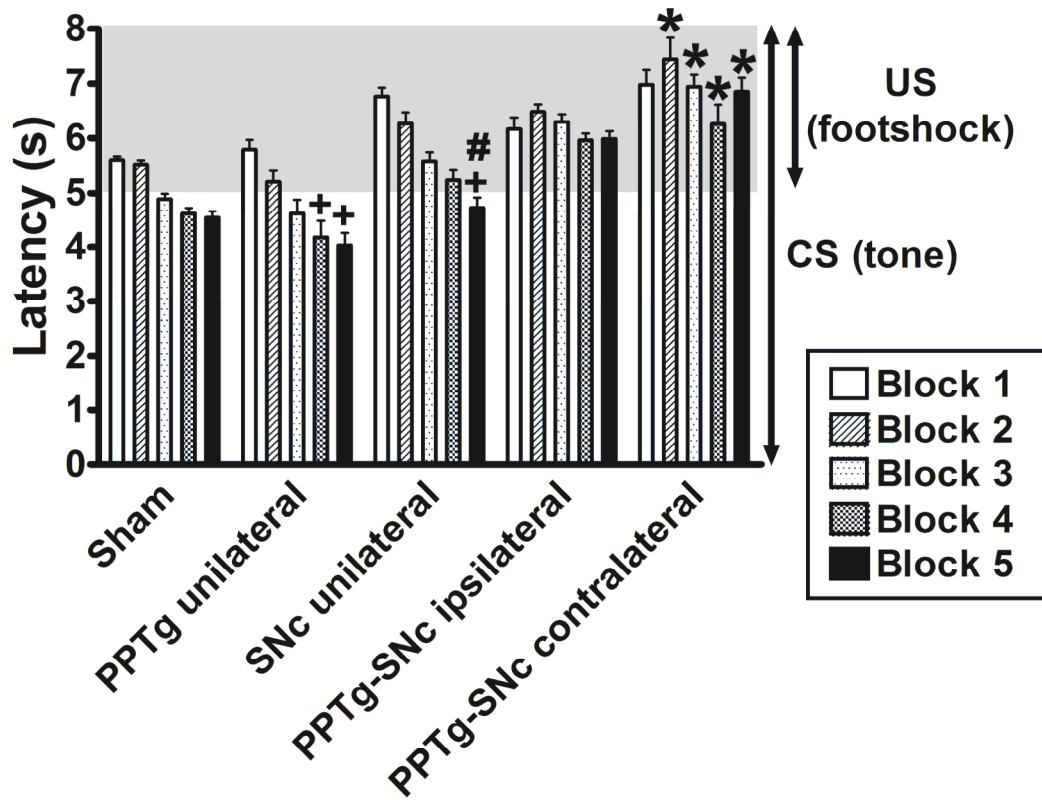


Fig. S1. Effect of the PPTg and/or SNc lesion on latency to respond to the CS and US in the first day of training in the 2-way active avoidance task. Bars represent the mean \pm SEM latencies to cross to the opposite side of the shuttle box after the CS-US onset averaged in blocks of 10 trials. * $P < 0.05$ compared to sham rats in the same block; + $P < 0.05$ compared to the block 1 in the same group; # $P < 0.05$ compared to the block 2 in the same group; two-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls test.

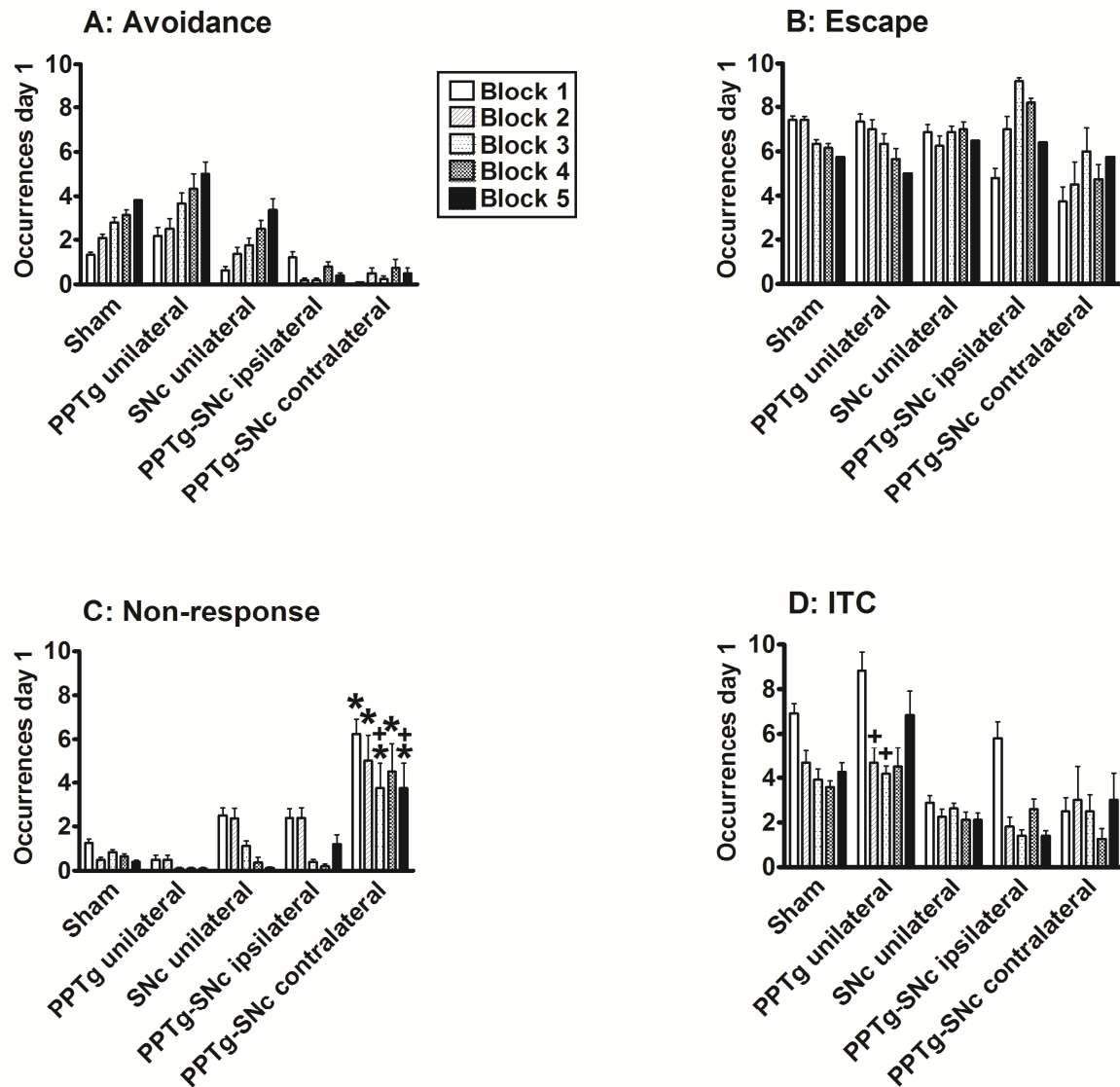


Fig. S2. Effect of the PPTg and/or SNc lesion on learning of the 2-way active avoidance. The bars represent the mean \pm SEM number of avoidance, escape, non-response or inter-trial crossings (ITC) averaged in blocks of 10 trials * $P < 0.05$ compared to sham in the same day; + $P < 0.05$ compared to the same group on day 1; two-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls test.

Table S1

Pearson correlation between the number of active avoidances and non-response of rats bearing lesions in the PPTg and/or SNc

| | <i>r</i> | <i>p</i> |
|------------------------|----------|----------|
| Sham | -0.35 | 0.03 |
| PPTg unilateral | -0.49 | 0.03 |
| SNc unilateral | -0.51 | 0.01 |
| PPTg-SNc ipsilateral | -0.47 | 0.07 |
| PPTg-SNc contralateral | -0.55 | 0.06 |

Table S2

Pearson correlations between the number of active avoidances and intertrial crossings (ITC) of rats bearing lesions in the PPTg and/or SNc

| | <i>r</i> | <i>p</i> |
|------------------------|----------|----------|
| Sham | - 0.01 | 0.95 |
| PPTg unilateral | 0.27 | 0.26 |
| SNc unilateral | - 0.05 | 0.98 |
| PPTg-SNc ipsilateral | 0.49 | 0.06 |
| PPTg-SNc contralateral | 0.93 | 0.001 |